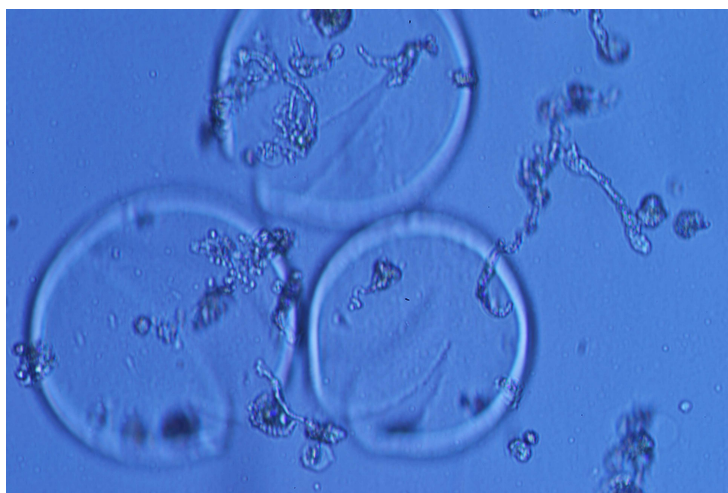


UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.



DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL  
FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO.

**“DISEÑO DE UN MEDIO DEFINIDO PARA LA  
MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS EN  
BAJA TENSION DE OXÍGENO”**



**Juan Manuel Caínzos Cagiao**



D. Pedro J García Herradón, Profesor Titular y Dña. Mónica Barrio López, Profesora Contratada Interina, ambos del Departamento de Patoloxía Animal,

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada: "Diseño de un medio definido para la maduración in vitro de ovocitos bovinos en baja tensión de oxígeno" de la que es autor el licenciado en veterinaria D. Juan Manuel Cainzos Cagiao ha sido realizada en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo nuestra dirección y, en la opinión de los abajo firmantes, este trabajo reúne las condiciones legales precisas para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos y sellamos el presente en Lugo a 5 de Mayo de 2012.

Fdo. Pedro J García Herradón

Fdo Mónica Barrio López

*“Los premios individuales en los deportes de equipo son injustos”.*

Y este es un *deporte* de equipo.

Independientemente de la mejor o peor calidad del estudio aquí expuesto,  
yo sería incapaz de elaborar y llegar a defender la siguiente de tesis  
sin la dedicación y el esfuerzo realizado anteriormente  
por el equipo de la unidad docente de Obstetricia y Reproducción Animal,  
que año tras año, *temporada tras temporada*,  
ha permitido adquirir y desarrollar el conocimiento y *know-how*  
necesario para llevar a cabo este trabajo.

Pero no solo me quedo con el amplio conocimiento adquirido de ellos,  
tanto de los que están como de los que ya se fueron,  
sino con el trato humano y el ambiente de trabajo cordial en el cual me encuentro  
muy a gusto.

Porque este es un *deporte* de equipo, y el equipo, lo hacen los jugadores.

Solo tres pausas

La primera, para reconocer y agradecer el trabajo y la dedicación empeñados a lo largo de estos cinco años por mi director de tesis, el Dr García Herradón. Si su ánimo y colaboración en los momentos difíciles, nunca hubiera acabado.

Gracias Pedro.

La segunda, para mi directora de tesis, la Dr Barrio López. Una de las cosas buenas de este trabajo ha sido la oportunidad de trabajar y aprender a su lado. Seguro que dirás que no es para tanto, pero créeme, lo es.

La tercera, para expresar mi gratitud a Icos Soc. Coop Galega, especialmente a mis compañeros de Icos –Taboada (Josecho, Foz y Manolo) y a Jose Ansoar, por toda la colaboración que me ofrecieron.

Gracias a todos

Qui non intelligit, aut taceat, aut discat

*"Ella, hace todo. Y todo, lo hace bien."*

mi gratitud y todo mi amor a *Rebe*,

mi esposa, compañera y amiga, por su inestimable apoyo y comprensión

por sobrellevar el abandono al que ha estado sometida durante todas las horas que he dedicado a éste trabajo.

También gracias, una y otra vez a Sara y Atia, mis hijas,

recuerdo de un ideal realizado, también con su ayuda.

## ÍNDICES

# Índice de Contenidos

Índice de tablas ii

Índice de figuras iii

Abreviaturas iv

Resumen – Resumo – Abstract v

**CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN** **pág. 1**

**CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA** **pág. 9**

ASPECTOS HISTÓRICOS	10	
I. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS CÚMULO-OVOCITO	15	
I.1. Obtención de los CCO a partir ovario	15	
I.1.1. Duración del transporte ovárico y temperatura a la que se mantienen	16	
I.1.2. Técnicas utilizadas para la recuperación de COO	17	
I.1.3. Características del folículo que condicionan la calidad del ovocito	19	
I.2. Obtención de CCO de animales vivos	22	
I.3. Factores intrínsecos determinantes de la calidad y cantidad de los ovocitos obtenidos	23	
I.4. Selección y clasificación de los ovocitos	31	
II. MADURACIÓN DEL OVOCITO	34	
II.1. Maduración in vivo	34	
II.1.1. Ovogénesis y foliculogénesis	34	
II.1.2. Meiosis ovocitaria	39	
II.1.3. Interacciones del ovocito con las células foliculares	41	
II.1.4. El fluido folicular	43	
II.1.5. Condiciones físicas existentes en el interior de los folículos	46	
II.1.6. Maduración del ovocito	47	
II.1.7. Competencia del ovocito	50	
II.2. Maduración in vitro	53	
II.2.1. Composición del medio de maduración	55	
II.2.2. Macromoléculas	56	
II.2.3. Sustratos energéticos	58	
II.2.4. Aminoácidos	62	
II.2.5. Hormonas	63	
II.2.6. Factores de crecimiento	66	
II.2.7. Atmósfera gaseosa	67	
III. PREPARACIÓN ESPERMÁTICA Y FECUNDACIÓN IN VITRO	68	
III.1. Preparación de los espermatozoides	68	
III.2. Capacitación in vitro	69	
III.3. Presencia de células del cúmulo	70	
III.4. Medio y condiciones de cultivo empleadas durante la fecundación	71	
III.5. Concentración de espermatozoides y duración del cocultivo	71	
III.6. Sustancias estimulantes de la motilidad espermática	72	
III.7. Anormalidades durante el proceso de fecundación	73	
IV. CULTIVO IN VITRO	74	

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	pág. 81
CAPITULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS	pág. 85
I. PROCESO DE CULTIVO IN VITRO	86
II. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS	89
II.1. Evaluación de la maduración nuclear	89
II.2. Evaluación del desarrollo embrionario	91
II.3. Determinación del número de núcleos	91
II.4. Análisis estadístico	92
III. DISEÑO EXPERIMENTAL	92
a. Experimento 1: Evaluación de la sustitución del suero en el medio de maduración	93
b. Experimento 2: Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de glucosa cuando la MIV se realiza en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	94
c. Experimento 3: Evaluación del efecto del EGF cuando la MIV se realiza en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	95
d. Experimento 4: Evaluación del efecto de diferentes concentraciones r-hFSH cuando la MIV se realiza en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	96
e. Experimento 5: Evaluación de la duración del período de MIV en presencia de r-hFSH, en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	96
f. Experimento 6: Evaluación del efecto de la FIV en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno	97
CAPITULO 5. RESULTADOS	pág. 99
I. Evaluación de la sustitución del suero en el medio de maduración	100
II. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de glucosa cuando la MIV se realiza en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	101
III. Evaluación del efecto del EGF cuando la MIV se realiza en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	107
IV. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones r-hFSH cuando la MIV se realiza en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	108
V. Evaluación de la duración del período de MIV en presencia de r-hFSH, en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y ausencia de suero	110
VI. Evaluación del efecto de la FIV en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno	111
CAPITULO 6. DISCUSIÓN	pg. 113
CAPITULO 7. CONCLUSIONES	pg. 141
CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pg.145

## Índice de Tablas

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Evolución de la producción de embriones (Datos IETS)	11
---	----

Tabla 2. Tamaño folicular y desarrollo ovocitario (de Kubota y Yang, 1998)	20
--	----

Tabla 3. Clasificación morfológica de los CC (Wurth y Kruij, 1992)	33
--	----

Tabla 4. Descripción morfológica de los estadios meióticos durante la maduración de los ovocitos bovinos (Kruip et al., 1983)	41
---	----

### MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 5. Medio SOF-Hepes	87
--------------------------	----

Tabla 6. Medio de fecundación TL-Stock (Bavister y Yanagimachi, 1997)	88
---	----

Tabla 7. Medio SOF-Cultivo	89
----------------------------	----

Tabla 8. Medio SOF-Maduración	94
-------------------------------	----

### RESULTADOS

Tabla 9. Efecto de la macromolécula empleada en el medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos eclosionados (% BLEcl).	100
--	-----

Tabla 10. Efecto de la macromolécula empleada en el medio de MIV sobre el número de células presentes en los blastocistos.	101
--	-----

Tabla 11. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 6 horas.	102
---	-----

Tabla 12. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 12 horas.	102
--	-----

Tabla 13. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 16 horas.	103
--	-----

Tabla 14. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 20 horas.	103
--	-----

Tabla 15. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 22 horas.	104
--	-----

Tabla 16. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 24 horas.	104
--	-----

Tabla 17. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos sobre los ovocitos divididos (% BL/ovocitos divididos).	106
---	-----

Tabla 18. Efecto de la adición de EGF o Hormonas en el medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos sobre los ovocitos divididos (% BL/ovocitos divididos).	107
--	-----

Tabla 19. Efecto de la adición de EGF o Hormonas en el medio de MIV sobre el número de células presentes en los blastocistos.	108
---	-----

Tabla 20. Efecto de la concentración de r-hFSH en el medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos sobre los ovocitos divididos (% BL/ovocitos divididos).	109
--	-----

Tabla 21. Efecto de la concentración de r-hFSH en el medio de MIV sobre el número de blastocistos eclosionados a los 10 dpi.	110
--	-----

Tabla 22. Efecto de la duración de la fase de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos eclosionados (% BLEcl).	111
--	-----

Tabla 23. Efecto de concentración de O <sub>2</sub> en la FIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos eclosionados (% BLEcl).	111
--	-----



## Índice de Figuras

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Representación esquemática del ovario. En la derecha, ilustración de un folículo antral con las respectivas capas celulares. Adaptado de Drummond *et al.* (2002). 35

Figura 2. Representación esquemática del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis (Mermillod *et al.*, 1999). 38

Figura 3. Ilustración esquemática de las etapas de la meiosis en los ovocitos de los mamíferos. Adaptado de Tsafiriri (1978). 40

Figura 4. Comunicaciones entre el ovocito y las células del cúmulo. 42

Figura 5. Modelo propuesto para las interacciones y actividades de las células del cúmulo y el ovocito (Tomado de Sutton y col, 2010). 61

Figura 6. Rutas metabólicas a través de las cuales la glucosa puede ser utilizada en el CCO (Tomado de Sutton y col, 2010). 61

### MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 7. Ovocito en fase de Vesíc. Germinal 90

Figura 8. Ovocito en fase de Metafase I 90

Figura 9. Ovocito en fase de Metafase II 90

Figura 10. Imagen de un blastocisto teñido para conteo de núcleos 92

Figura 11. Esquema de Trabajo 93

Figura 12. Diseño experimental 98

### RESULTADOS

Figura 13. Evolución de la maduración nuclear en función de la concentración de glucosa presente en el medio de maduración. 105

## Abreviaturas

### A

ACT: activación  
 ADN: ácido desoxirribonucleico  
 AMH: hormona anti-mülleriana (Anti-Müllerian Hormone)  
 AMPc: Adenosín monofosfato cíclico  
 ARN: ácido ribonucleico  
 ARNm: ARN mensajero  
 ARNr: ARN ribosomal  
 ATP: adenosina trifosfato

### B

BME: medio basal Eagle (Basal Medium Eagle)  
 BMP15: proteína morfogenética del hueso 15  
 BO: Medio Brackett y Oliphant  
 BSA: albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)  
 BSA-FAF: albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (fatty acid-free BSA)  
 BSE: encefalopatía espongiforme bovina

### C-D-E

Ca<sup>+2</sup>: ión calcio  
 CCO: complejos cúmulo-ovocito (Cumulus-Oocyte Complex)  
 CIV: cultivo in vitro  
 CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
 D0: día cero  
 EAA: amino ácidos esenciales (Essential Amino Acids)  
 ECM: expansión de la matriz extracelular (Extracellular matrix expansión)  
 ECS: suero de vaca en celo (Estrous Cow Serum)  
 EDTA: ácido etilen diamino tetracético (ethylenediaminetetracetic)  
 EGF: factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)  
 EGFr: receptor de EGF (EGF Receptor)  
 Exp: Experimento

### F-G

FCS: suero fetal bovino (Fetal Calf Serum)  
 FF-MAS: esteroide activador de la meiosis del fluido folicular (follicular fluid meiosis-activating steroid)  
 FGF: factor de crecimiento fibroblástico (Fibroblast Growth Factor)  
 FIV: fecundación in vitro  
 FSH: hormona estimulante del folículo (Follicle-Stimulating Hormone)  
 FSHr: receptor FSH (FSH Receptor)  
 GDF9: factor de crecimiento-transformación 9  
 G-Mat: Medio de Gardner (Gardner et al 2001)

GSH: glutatión reducido  
 GV: vesícula germinativa  
 GVBD: ruptura de la vesícula germinativa (Germinal Vesicle Breakdown)

### H

Hg: mercurio  
 hCG: gonadotrofina coriónica humana (Human Chorionic Gonadotrophin)  
 HIF I: factor inducido por la hipoxia I  
 HPRT: enzima hipoxantina-fosforibosiltransferasa  
 hpi: horas postinseminación Ca<sup>+2</sup>: ión calcio  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

### I-K-L

IA: inseminación artificial  
 ICSI: inyección espermática intracitoplasmática (Intracytoplasmic Sperm Injection)  
 IETS: Asociación internacional de transferencia de embriones (International Embryo Transfer Society)  
 IGF: factor de crecimiento asociado a la insulina (Insulin-like growth factor)  
 IGF-1: factor de crecimiento asociado a la insulina-1  
 IGF-2: factor de crecimiento asociado a la insulina-2  
 ITS: Insulina-Transferrina-Selenito  
 KSOM: potassium simplex optimized medium  
 LH: hormona luteinizante (Luteinizing Hormone)  
 LOS: síndrome de exceso de volumen fetal (Large Offspring Syndrom)

### M

MAS: esteroide activador de la meiosis  
 MEM NEAA: Medio Mínimo Esencial con Aminoácidos no Esenciales (Non-Essential Amino Acids)  
 MI: metafase I  
 MII: metafase II  
 MIV: maduración in vitro  
 MOET: ovulación múltiple y transferencia embrionaria (Multiple Ovulation and Embryo Transfer)  
 MPF: factor promotor de la fase M (M-phase Promoting Factor)  
 MPGF: factor de crecimiento del pronúcleo masculino (Male Pronucleus Growth Factor)  
 mSOF: SOF modificado  
 mTCM-199: TCM-199 modificado

### N

Na<sup>+</sup>: ión sodio  
 NaCl: cloruro sódico  
 NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido  
fosfato en su forma oxidada  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido  
fosfato en su forma reducida  
NEFA: ácidos grasos no esterificados (Non-  
esterified fatty acids)  
NT: transferencia nuclear (Nuclear Transfer)

## O

O<sub>2</sub>: oxígeno  
OMI: factor inhibidor de la meiosis  
OPU: Ovum Pick-Up  
OSFs: factores de crecimiento ovocitario

## P

PB: cuerpo polar (Polar Body)  
PBS: solución salina fosfatada (Phosphate  
Buffered Saline)  
pFSH: FSH de origen porcino (porcine FSH)  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>  
PHE: penicilamina hipotaurina y epinefrina  
Pi: post-inseminación  
PIV: producción *in vitro*  
PKA: proteína quinasa A  
PL3: Medio de Park and Lin (Park y Lin, 1993)  
PNM: pronúcleo masculino  
PPP: vía de las pentosas fosfato (Pentoses  
Phosphate Pathway)  
PVA: alcohol polivinílico (Polyvinyl Alcohol)  
PVP: polivinil pirrolidona (Polyvinyl-pyrrolidone)  
PVP-360: PVP de peso molecular 360 kDa  
PVP-40: PVP de peso molecular 40 kDa

## R-S

r-hFSH: FSH recombinante humana  
r-hLH: LH recombinante humana  
ROS: especies reactivas de oxígeno (Reactive  
Oxygen Species)  
SCNT: transferencia nuclear de las células  
somáticas (Somatic Cell Nuclear Transfer)  
SOF: fluido oviductal sintético (Synthetic  
Oviductal Fluid)  
SOFaa: SOF con amino ácidos  
SPDF: factor estimulador del pronúcleo  
espermático (sperm pronucleus development  
factor)  
Spz: espermatozoides  
SSS: sustituto sintético del suero

## T

TAO: Transiluminación-aspiración ovárica  
TALP: medio Tyrodes modificado (Tyrode  
Albumin Lactate Pyruvate medium)  
TCM-199: medio de cultivo 199 (Tissue Culture  
Medium 199)

TGF- $\alpha$ : factor de crecimiento transformante  $\alpha$   
(Transforming Growth Factor  $\alpha$ )  
TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$   
(Transforming Growth Factor  $\beta$ )

## U-Z

uFSH: FSH de origen urinario (Urinary FSH)  
UI: unidades internacionales  
VG: vesícula germinativa  
ZP: zona pelúcida.

## Resumen

La producción de embriones bovinos *in vitro* (PIV) representa, en la actualidad, una alternativa frente a las técnicas convencionales de obtención de embriones *in vivo*. Sin embargo, esta técnica es aún poco eficiente lo que dificulta su utilización a escala comercial. Las condiciones a las que son sometidos a los gametos, especialmente en la fase de maduración, y los embriones durante la PIV condicionan los resultados finales. Por tanto, para incrementar la eficiencia de la PIV es necesario empezar por la maduración *in vitro* aclarando los mecanismos que la controlan y mejorar las condiciones del cultivo al objeto de que se desarrolle con la máxima normalidad. Nuestra hipótesis de trabajo es que utilizando el mismo medio básico y la misma atmósfera gaseosa durante todas las etapas del proceso (maduración, fecundación y cultivo) y eliminando las sustancias de origen biológico, podremos obtener unos resultados más homogéneos y unos embriones de mayor calidad.

Para lograrlo, hemos sustituido las fuentes proteicas utilizadas de manera habitual, cuya composición es indefinida y variable (FCS y BSA) por una macromolécula sintética (PVP-40) (Exp 1). Para este experimento se realizaron 4 replicados usando un total de 622 CCO que fueron madurados en SOF suplementado con cada una de las macromoléculas consideradas. El análisis estadístico de los resultados *demostró* que no había diferencias estadísticamente significativas ni en la tasa de división ni en el número de blastocistos obtenidos tras 8 días de cultivo entre los tres tratamientos considerados.

En el segundo experimento (Exp 2), se determinó el efecto de diferentes concentraciones de glucosa (1,5; 5,6 y 10 mM) en un medio simple libre de proteínas y en una atmósfera gaseosa con un 6% de O<sub>2</sub>, durante la maduración de los ovocitos, evaluando la evolución nuclear y la producción de blastocistos. Para ello se emplearon 2008 CCOs, que maduraron en SOF suplementado con tres concentraciones diferentes de glucosa, 1,5 mM (509 CCO), 5,6 mM (488 CCO) y 10 mM (510 CCO), así como en un grupo control (501 CCO). Los resultados obtenidos indican que cuando la maduración se produce con una concentración de O<sub>2</sub> del 6% la evolución nuclear está condicionada por la concentración de glucosa. Así, cuando la concentración de glucosa presente en el medio de maduración era 10 mM, los porcentajes de división y producción de blastocistos fueron semejantes a los obtenidos al utilizar el medio control.

Posteriormente se evaluó la posibilidad de substituir las hormonas de origen biológico, cuya presencia provoca la indefinición del medio, por otras sustancias de composición conocida. Así se evaluó el empleo del EGF (Exp3), mediante el cultivo de un total 840 COCs (5 réplicas), que fueron asignados al azar a cada uno de los tres tratamientos considerados: mSOF-Hormonas (n=293), mSOF-EGF (n=281) y mSOF (n=266). El análisis estadístico de los resultados indicó un mayor porcentaje de blastocistos totales en el grupo cultivado en un medio de maduración suplementado con hormonas (26,47%) frente a los grupos en los que se incorporó EGF o no se utilizó ningún suplemento (19,57 y 18,17% respectivamente), pero las diferencias en los porcentajes de blastocistos eclosionados a los 10 días p.i. carecían de significación estadística.

También se evaluó el efecto del empleo de diferentes concentraciones de FSH humana recombinante (r-hFSH) (1, 0.5 y 0.01 UI frente a control; Exp 4) y de la duración del período de maduración (24, 28 y 32 horas; Exp 5). El análisis estadístico de los resultados indicaba que la utilización de r-hFSH a una concentración de 1 UI/mL de permite lograr tasas de división, de blastocistos y de eclosión similares a las obtenidas empleando la combinación de hormonas naturales utilizada de manera habitual. Cuando evaluamos el efecto de la duración del periodo de maduración comprobamos que al prolongarlo más de 24 horas los resultados no mejoraban.

En el último ensayo se evaluó el efecto de utilizar una concentración del 6% de O<sub>2</sub> durante el cocultivo de los espermatozoides y los ovocitos bovinos, frente al 20% de O<sub>2</sub> utilizado de manera habitual. Para ello se han realizado 4 réplicas con un total de 883 CCO. Nuestros resultados demostraron que los porcentajes de división a las 48 horas y de blastocistos en los días 7 y 8, de blastocistos totales y eclosionados eran superiores en el grupo de ovocitos fecundados en 6% de O<sub>2</sub>. Además, en el caso de los blastocistos de día 8 y eclosionados las diferencias eran estadísticamente significativas (p<0.01).

Todo ello nos permite afirmar que es posible utilizar una misma atmósfera gaseosa durante todas las etapas del proceso (maduración, fecundación y cultivo) y substituir las sustancias de origen biológico por PVP-40 y r-hFSH sin que ello provoque ningún efecto negativo sobre la producción de blastocistos ni la calidad de los mismos.

## Resumo

A produción de embrións bovinos *in vitro* (PIV) representa na actualidade, unha alternativa fronte ás técnicas convencionais de obtención de embrións. Nembargantes, esta técnica aínda é pouco eficiente o que dificulta o seu emprego a escala comercial. As condicións ás que son sometidos os gametos, especialmente na fase de maduración, e os embrións, durante a PIV, condicionan os resultados finais. Polo tanto, para incrementa-la eficiencia da PIV é necesario empezar pola maduración *in vitro* aclarando os mecanismos que a controlan e mellora-las condición de cultivo con fin de que se leve a cabo máxima normalidade. A hipótese de traballo é que empregando o mesmo medio básico e a mesma atmosfera gasosa durante tódalas etapas do proceso (maduración, fecundación e cultivo) e eliminando as substancias de orixe biolóxico, poderemos obter uns resultados máis homo xéneos e uns embrións de maior calidade.

Para acadalo, vimos de troca-las fontes proteicas empregas de xeito habitual, caracterizadas por unha composición indefinida e variable (FCS e BSA) por unha macromolécula (PVP-40) (Exp 1). Para este experimento realizáronse 4 replicados empregando un total de 622 CCO que foron madurados en SOF suplementado con cada unha das moléculas consideradas. A análise estatística dos resultados amosou que non había diferenzas estatisticamente significativas ni na taxa de división ni no número de blastocistos obtidos tras 8 días de cultivo entre os tres tratamentos considerados.

No segundo experimento (Exp 2), determinouse o efecto de diferentes concentracións de glicosa (1,5; 5,6 e 10 mM) nun medio simple libre de proteínas e nunha atmosfera gasosa con 6% de O<sub>2</sub>, durante a maduración dos ovocitos, avaliando a evolución nuclear e a produción de blastocistos. Para iso empregáronse 2008 CCO que maduraron en SOF suplementado con tres concentracións diferentes de glicosa; 1,5 mM (509 CCO), 5,6 mM (488 CCO) e 10 mM (510 CCO), así coma tamén un grupo control (501 CCO). Os resultados obtidos indican que cando a maduración ten lugar cunha concentración de O<sub>2</sub> do 6% a evolución nuclear está condicionada pola concentración de glicosa. Así, cando a concentración de glicosa presente no medio de maduración era 10 mM, as porcentaxes de división e produción de blastocistos foron semellantes ás obtidas ó empregar o medio control.

Posteriormente avaliouuse a posibilidade de substituí-las hormonas de orixe biolóxico xa que a súa presenza provoca a indefinición do medio, por

outras substancias de orixe coñecido. Así avaliou se o emprego de EGF (Exp 3), mediante o cultivo dun total de 840 CCO (5 réplicas), que foron asignados ó chou a cada un dos tres tratamentos considerados: mSOF-Hormonas (n=293), mSOF-EGF (n=281) e mSOF (n=266). A análise estatística dos resultados indicou unha maior porcentaxe de blastocistos totais no grupo madurado no medio suplementado con hormonas (26,47%) fronte ós grupos nos que se incorporou EGF ou no que non se empregou ningún suplemento (19,57 e 18,17% respectivamente), pero as diferenzas nas porcentaxes de blastocistos eclosionados ós 10 días pi carecían de significación estatística.

Tamén se avaliou o efecto do emprego de diferentes concentración de FSH recombinante humana (r-hFSH) (1, 0,5 e 0,01 UI fronte a control; Exp 4) e da duración do período de maduración (24, 28 e 32 horas; Exp 5). A análise estatística dos resultados indicou que o emprego de r-hFSH a unha concentración de 1 UI/mL permite acadar taxas de división, de blastocistos e de eclosión similares ás obtidas empregando a combinación de hormonas naturais empregadas de xeito habitual. Cando avaliamos o efecto da duración do período de maduración comprobamos que ó prolongalo máis de 24 horas os resultados non melloraban.

No derradeiro ensaio avaliou se o efecto de empregar unha concentración do 6% de O<sub>2</sub> durante o cultivo conxunto dos espermatozoides e dos ovocitos bovinos, fronte ó 20% de O<sub>2</sub> empregado de xeito habitual. Para iso leváronse a cabo 4 réplicas con un total de 883 CCO. Os nosos resultados amosaron que as porcentaxes de división ás 48 horas e de blastocistos nos días 7 e 8, de blastocistos totais e eclosionados eran superiores no grupo de ovocitos fecundados no 6% de O<sub>2</sub>. Ademais, no caso dos blastocistos de día 8 e eclosionados as diferenzas eran estatisticamente significativas (p<0.01).

Todo isto permítenos afirmar que é posible empregar unha mesma atmosfera gasosa durante todas as etapas do proceso (maduración, fecundación e cultivo) e trocar as substancias de orixe biolóxico por PVP-40 e r-hFSH sin que isto provoque ningún efecto negativo sobre a produción de blastocistos nin na calidade dos mesmo.

## Abstract

*In vitro* bovine embryo production (IVP) represents, at present, an alternative to conventional techniques for obtaining embryos *in vivo*. However, this technique is still inefficient making it difficult to use on a commercial scale. The conditions which are subject to the gametes, especially in the maturation stage, and embryos during IVP determine the final results. Therefore, to increase the efficiency of IVP is necessary to start from *in vitro* maturation, and clarify the mechanisms that control the IVM and improve growing conditions. Our working hypothesis is that using the same basic medium and the same gas atmosphere during all stages of the process (maturation, fertilization and culture) and eliminating substances of biological origin, we can obtain more consistent results and a higher quality embryo.

To achieve it, we replaced the protein sources used usually, which are indefinite and variable composition (FCS and BSA) by a synthetic macromolecule (PVP-40) (Exp 1). For this experiment, a total of 622 BCC (4 replicates) were matured in SOF supplemented with each of the macromolecules considered. Statistical analysis showed no statistically significant differences either in the cleavage rate or the number of blastocysts obtained after 8 days of culture among the three treatments considered.

In the second experiment (Exp 2), the effect of different concentrations of glucose (1.5, 5.6 and 10 mM) was evaluated, in a simple and free-proteins medium, in a gaseous atmosphere with a 6% O<sub>2</sub>, for maturation of oocytes, evaluating nuclear evolution and blastocysts production. 2008 CCO were matured in SOF supplemented with three different concentrations of glucose, 1.5 mM (509 CCO), 5.6 mM (488 CCO) and 10 mM (510 CCO) and also, a control group (501 BCC). The results showed that when maturation occurs at a concentration of 6% O<sub>2</sub> nuclear evolution is conditioned by the glucose concentration. Thus, when the glucose concentration in the maturation medium was 10 mM, the percentage of division and blastocysts production were similar to those obtained using the control medium.

Then, the possibility of replacing the hormones of biological origin was evaluated. The presence of those hormones causes the uncertainty of the environment, and other substances of known composition could be available. So, the use of EGF (Exp3) was evaluated, through the cultivation of 840 COCs (5 replicates), which were randomly assigned to each of the three treatments considered: mSOF-Hormones (n = 293), mSOF-EGF (n = 281) and mSOF (n =



266). Statistical analysis of the results indicated a higher percentage of total blastocysts in the group cultured in a maturation medium supplemented with hormones (26.47%) compared to groups in which EGF was incorporated or not used any supplements (19, 57 and 18.17% respectively), but differences in the percentages of blastocysts hatched at 10 days pi lacked statistical significance.

We also evaluated the effect of using different concentrations of recombinant human FSH (r-hFSH) (1, 0.5 and 0.01 IU versus control; Exp 4) and the length of the maturation period (24, 28 and 32 hours Exp 5). Statistical analysis of results indicated that the use of r-hFSH at a concentration of 1 IU / mL can achieve rates of division, and hatching blastocysts similar to those obtained using a combination of natural hormones used in the usual manner. When we evaluated the effect of maturation length, we found that extending it over 24 hours did not improve the results.

In the last trial, the effect of using a concentration of 6% O<sub>2</sub> during the coculture of sperm and bovine oocytes was evaluated, compared with 20% O<sub>2</sub> used routinely. To this assay, 4 replicates with a total of 883 CCO were developed. Our results showed that the percentages of cleavage at 48 hours and day 7 and 8 blastocysts, total and hatched blastocysts were higher in the group of oocytes fertilized in 6% of O<sub>2</sub>. Moreover, in the case of blastocysts hatched on 8 and the differences were statistically significant ( $p < 0.01$ ).

This allows us to say that you can use the same gas atmosphere during all stages of the process (maturation, fertilization and culture) and replace substances of biological origin on PVP-40 and r-hFSH without causing any negative effect on the blastocyst production or their quality.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

La producción animal, tal y como la concebimos en la actualidad, está muy ligada a los avances logrados en el campo de la biotecnología. Así, la aplicación de la inseminación artificial y de la transferencia de embriones han contribuido significativamente a la mejora genética en la especie bovina, principalmente en los rebaños lecheros. La producción de embriones *in vitro* es una de las biotecnologías reproductivas con mayor potencial aplicativo en la producción bovina, ya que otras muchas técnicas, como la transferencia de embriones, la preselección del sexo, la clonación y la producción de animales transgénicos solamente son posibles cuando disponemos de un procedimiento capaz de garantizar la producción continua de un gran número de embriones y su supervivencia fuera del organismo hasta el momento de ser transferidos a una receptora. Las técnicas para producir cigotos y embriones *in vivo* a partir de hembras sometidas a estimulación ovárica son menos útiles, debido a su mayor coste y a la dificultad de recuperar un elevado número de embriones en un mismo estado de desarrollo.

La producción de embriones bovinos *in vitro* (PIV) representa en el momento actual una buena alternativa a las técnicas utilizadas para la producción de embriones *in vivo* (Gordon y Lu, 1990; Hasler, 1993; Looney y col, 1994), ya que se ha demostrado que la transferencia de éstos embriones a hembras receptoras permite lograr tasas de gestación y de nacimiento de terneros vivos, similares a las obtenidas con embriones producidos mediante programas MOET (Brackett y col, 1982; Goto y col, 1988; Sirard y col, 1988; Fukuda y col, 1990; Monson y col, 1992). Esta técnica presenta numerosas ventajas: reduce de los costes de producción de los embriones, acorta el intervalo intergeneracional acelerando de los programas de mejora genética, posibilita la obtención de descendientes de hembras que deben ser sacrificadas, permite aplicar técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de interés productivo, favorece el aprovechamiento de semen sexado (Herradón y col, 2007). Además, como hemos señalado anteriormente, ha facilitado el desarrollo de otras biotecnologías de la reproducción como la aspiración ovárica ecoguiada, también conocida como *ovum pick up* (OPU), la inyección intracitoplasmática

de espermatozoides (ICSI) y la transferencia de núcleos procedentes de células somáticas (SCNT) (Hansen y Block, 2004).

Sin embargo, esta técnica es todavía poco eficiente ya que el número de blastocistos obtenidos a partir de los ovocitos sometidos a la maduración, fecundación y cultivo in vitro es bajo, lo que dificulta su utilización a gran escala. Así, el porcentaje de ovocitos fecundados que llegan a evolucionar a embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%, lo que indica que las condiciones utilizadas durante el proceso de producción de embriones in vitro no son capaces de reproducir los microambientes que existen in vivo. Además, los embriones producidos in vitro son de una calidad inferior a los obtenidos in vivo, presentando diferencias estructurales, funcionales y en su expresión génica.

La técnica utilizada para producir embriones in vitro consta de tres etapas claramente diferenciadas: maduración de los ovocitos (MIV), fecundación in vitro (FIV) y cultivo de los cigotos hasta alcanzar la etapa de blastocistos (CIV). Se ha demostrado que las condiciones a las que son sometidos los ovocitos durante la MIV repercuten notablemente en los resultados finales, pudiéndose comprobar que la competencia de los ovocitos madurados in vivo es notablemente superior a la de los madurados in vitro (Dieleman y col, 2002). Además, se ha demostrado que el cultivo de los gametos y embriones en condiciones inapropiadas induce cambios epigenéticos en el genoma embrionario (Niemann y Wrenzycki, 2000) y en la expresión génica (Rinaudo y Schultz 2004). Uno de los problemas derivados de la producción de embriones in vitro es el conjunto de alteraciones que aparecen durante el desarrollo fetal conocidas como Large Offspring Syndrome (LOS). Este síndrome ha sido asociado con fallos en el desarrollo embrionario temprano (Young y col, 1996 y 1999), pero también podría estar relacionado con la (pre-)maduración de los ovocitos (Holm y col, 1996).

Un punto clave para mejorar la eficiencia de la MIV de los ovocitos bovinos es identificar claramente sus necesidades durante el proceso y como responden a las variaciones en la disponibilidad de nutrientes y a los cambios en su medio ambiente.

Durante las dos últimas décadas los procedimientos utilizados durante la maduración y la fecundación *in vitro* prácticamente no se han modificado. Así, en la mayor parte de los laboratorios se continua empleando la técnica de maduración descrita en 1989 por Fukui y Ono, consistente en cultivar los ovocitos inmaduros durante 24 horas en TCM-199, suplementado con un 10% de suero fetal, gonadotrofinas (FSH y LH), y 17  $\beta$ -estradiol, a una temperatura de 38,5° C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Sin embargo, durante este mismo periodo los procedimientos utilizados para el cultivo *in vitro* de los embriones han evolucionado sensiblemente.

Por todo ello consideramos que una posible alternativa para mejorar la eficiencia de la PIV es actuar sobre las etapas de maduración y fecundación *in vitro* de los ovocitos bovinos prestando atención especial a tres aspectos: 1) la composición del medio de cultivo; 2) la atmósfera gaseosa y 3) los suplementos añadidos al medio.

Este TCM-199 ha sido diseñado en sus orígenes para satisfacer las necesidades de las células somáticas durante periodos de cultivo prolongados. Sin embargo, este medio podría no ser el más adaptado a las necesidades complejas y dinámicas de los ovocitos durante maduración. El fluido oviductal sintético (SOF) es uno de los medios más comúnmente utilizados durante el cultivo *in vitro* de los embriones bovinos y por ello se plantea su empleo, también, durante la maduración y así evitar continuos cambios en la concentración de iones, sustratos energéticos, pH y osmolaridad, ya que se ha demostrado que la utilización de SOF, suplementado con distintas sustancias, durante la maduración de los ovocitos bovinos permite obtener resultados comparables a los logrados con TCM-199 (Oyamada y Fukui, 2004; Ruibal y col, 2006).

Otro aspecto interesante de la maduración *in vitro* es que se realiza, generalmente, en una atmósfera con un contenido en oxígeno del 20%, situación que difiere notablemente de la existente en el interior del tracto genital. Así, los niveles de oxígeno en los folículos ováricos, el oviducto y el útero varían entre 1,5 y 8 % (Harvey, 2007). Algunos estudios han analizado el efecto de la MIV en bajas tensiones de oxígeno, pero los resultados son

contradictorios, observándose mejoras en el porcentaje de blastocistos (Karja y col, 2004; Park y col, 2005), ausencia de diferencias (Iwamoto y col, 2005) o efectos desfavorables (Oyamada y Fukui, 2004). La mayoría de los estudios realizados indican que la utilización de una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire durante la maduración in vitro permite obtener mejores resultados, por lo que se ha señalado que la maduración nuclear depende de la disponibilidad de oxígeno (por revisión ver: Cetica et al., 2003) y que la reducción de la concentración de O<sub>2</sub>, compromete la posterior competencia para soportar el desarrollo (Watson et al., 2000).

Sin embargo, algunos trabajos demuestran que los ovocitos madurados en presencia de elevadas concentraciones O<sub>2</sub> sufren las consecuencias de las elevadas concentraciones de sustancias oxígeno reactivas (ROS) (Hashimoto et al., 2000a). Por ello, se ha investigado la posibilidad de madurar los ovocitos bovinos utilizando atmósferas con un bajo contenido en O<sub>2</sub>, situación que parece posible cuando se incrementa la concentración de glucosa en el medio de maduración (Hashimoto et al., 2000a; Oyamada y Fukui, 2004). La actividad de ciertos antioxidantes, puede variar en función de la concentración de glucosa y atmósfera gaseosa utilizada. La elevada concentración de glucosa puede favorecer la generación de radicales libres (Iwata et al., 1998; Oyamada y Fukui, 2004), un descenso en los niveles intracelulares de glutatión en el ovocito (Hashimoto et al., 2000b) y la asociación de altas concentraciones de glucosa con altas tensiones de O<sub>2</sub>, promueven la producción de ROS en el ovocito y compromete su competencia para el desarrollo (Hashimoto et al., 2000a, b). Por el contrario, el incremento de la concentración de glucosa en presencia de una baja tensión de O<sub>2</sub>, podría reducir la generación de ROS y por lo tanto promover el desarrollo a blastocistos (Hashimoto et al., 2000a; Oyamada y Fukui, 2004) e incrementar su criotolerancia a la vitrificación (Oyamada y Fukui, 2004).

Del mismo modo, a pesar de que la fertilización in vivo tiene lugar en ambientes con bajas tensiones de oxígeno (Bishop, 1956; Fischer y Bavister, 1993; Mastroianni and Jones, 1965), tradicionalmente esta fase del cultivo in vitro tiene lugar en concentraciones de oxígeno atmosférico, debido en parte a las altas tasas metabólicas de los espermatozoides. Sin embargo, se postula que

esas altas tasas metabólicas y las altas concentraciones de oxígeno podrían ocasionar un aumento perjudicial de las especies de oxígeno reactivo, lo que ocasionaría efectos perjudiciales en el desarrollo de los cigotos. En cuanto a la influencia de la concentración de oxígeno durante la FI, nos encontramos trabajos que postulan tanto efectos beneficiosos (Takahashi y Kanagawa, 1998), neutrales (Bermejo-Álvarez et al., 2010) como perjudiciales (Pinyopummintr y Bavister, 1995) de una tensión de oxígeno del 5% frente al 20%. Hasta donde tenemos constancia, únicamente existe un trabajo, realizado en la especie ovina, en el que se comprueba que la utilización de una baja tensión de oxígeno durante la fecundación mejora el número de blastocistos de alta calidad obtenidos (Leoni y col, 2007).

En cuanto a la suplementación proteica, se han añadido a los medios de maduración diversas sustancias de origen biológico, destacando el suero fetal, la albúmina sérica bovina (BSA) y algunas hormonas. Tanto el suero, como la BSA favorecen la maduración de los ovocitos bovinos, pero contribuyen a la indefinición del medio, por su composición compleja, indefinida y variable, y además, representan un riesgo de índole sanitaria. La sustitución de estas proteínas por macromoléculas sintéticas no metabolizables como la polivinil pirrolidona (PVP) nos permitirán disponer de un medio con una composición químicamente definida.

Por otra parte, las gonadotropinas hipofisarias y los esteroides juegan un importante papel en la regulación de la maduración de los ovocitos y se ha comprobado que la incorporación de gonadotropinas hipofisarias o placentarias al medio de cultivo favorece la maduración de los ovocitos bovinos aumentando el porcentaje de fecundación y de blastocistos obtenidos (Zuelke y Brackett, 1990). Sin embargo, las grandes variaciones en su grado de pureza, así como su contenido en sustancias contaminantes ocasionan una gran variabilidad en los resultados (Zuelke y Brackett, 1990; Choi et al., 2001). En la actualidad disponemos de FSH y LH de origen recombinante, cuya pureza permite conocer sus acciones individuales y evita la contaminación cruzada asociada a la utilización de los productos de origen hipofisario. A pesar de que existen algunos estudios en los que se analiza su efecto en la maduración in vitro, en ninguno de ellos se han empleado medios libres de suero y una

atmósfera pobre en oxígeno, y dado que el efecto de la FSH está condicionado por la composición del medio de cultivo (Ali y Sirard 2002), se considera necesaria dicha evaluación.

También se debe tener en cuenta también la posibilidad de la sustitución de las gonadotropinas hipofisarias por el Factor de crecimiento epidérmico (EGF), dado que la estimulación de la maduración nuclear por el EGF se ha demostrado en numerosas especies, como en ovocitos de ratas (Dekel y Sherizly, 1985), ratón (Das et al., 1991; Downs, 1989), porcino (Coskun y Lin, 1994; Ding y Foxcroft, 1994; Singh et al. 1993; Wang y Nina, 1995) y ovocitos humanos (Das et al., 1991). En la especie bovina el EGF también ha demostrado efectos inductores de la maduración ovocitaria y la expansión de las células del cúmulo, así como una mejoría en la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Harper and Brackett, 1993; Lonergan et al., 1996; Rieger et al., 1998), e incluso la maduración sin la adición al medio de gonadotropinas o FCS (Farin et al., 2007).



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## ASPECTOS HISTÓRICOS

El mecanismo de desarrollo embrionario ha sido un tema de gran importancia para la ciencia. Ya en el mundo antiguo, se aceptaba la posibilidad de que los seres vivos fueran generados a partir de lo inanimado. Aristóteles (384-322 a.C.) postuló que el hombre era el dador de la "semilla" y la mujer desempeñaba un papel pasivo, proporcionando el "suelo" en el que la "semilla" podría crecer. Galeno (131 a 210 d.C.), por el contrario, se imaginó que las dos semillas, masculina y femenina participaban igualmente en la constitución del embrión. Estas dos hipótesis fueron registradas con defensores y detractores, pero durante los siguientes 1000 años no se produjo ningún descubrimiento relevante sobre este tema.

En el siglo XVI se descubrió la estructura ovárica, pero no fue hasta el siglo siguiente cuando Niels Stensen (1638-1686) propuso el nombre de "ovarios" para lo que hasta ese momento se denominaban "testículos femeninos". William Harvey (1578-1657) fue uno de los primeros científicos que contribuyó al conocimiento de la función de los ovarios cuando reconoció que "Ex Ovo Omnia" es decir, "todos los seres vivos provienen de huevos". Otro aporte decisivo al conocimiento de la funcionalidad ovárica se debe a Reinier de Graaf (1641-1673) en su obra "*De organis mulierum generationis inservientibus*" (1672), a quien ha sido atribuido el descubrimiento de los folículos ováricos, y por lo cual han tomado su nombre. Sólo unos años después de los descubrimientos de de Graaf, otro holandés, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), utiliza su recién inventado microscopio para describir los espermatozoides humanos, en cuyo interior creyó observar criaturas minúsculas, el animaculi (más tarde denominados homúnculos).

Alrededor de 1770, Lazzaro Spallazani (1729-1799) realizó una contribución importante a través de un experimento preciso y audaz, mediante el cual recogió el semen de un caniche y lo depositó en la vagina de una perra, consiguiendo la gestación. Esta fue la primera descripción científica de la inseminación artificial (IA), aunque existen evidencias de que los árabes usaban ya la IA, de manera empírica, para la cría de caballos alrededor de año 700 a.c.

Los ovocitos se visualizaron finalmente en 1827 por Karl Ernst von Baer (1792-1876), que también introdujo el término "espermatozoides" para denominar a los gametos masculinos. Usando un instrumento óptico sin duda, más adecuado que el de Spallanzani, Oscar Hertwig (1849-1922) en 1875 demostró la penetración de los ovocitos por los espermatozoides y solo tres años más tarde, en 1898, Walter Heape trabajando con conejos, realizó con éxito la primera transferencia embrionaria. Sin embargo tenemos que esperar hasta el año 1977 para ver la primera fecundación *in vitro* de unos ovocitos bovinos madurados *in vitro*, por parte de Iritani y Niwa (1977).

Desde 1981, año en el que nació el primer ternero procedente de un embrión producido *in vitro* (Brackett *y col*, 1982), esta técnica ha experimentado en la especie bovina una evolución considerable. Los datos estadísticos publicados por la IETS indican que la evolución de la producción de embriones mediante fecundación *in vitro*, a nivel mundial, pasó de los 109.000 en el año 2001 a los 450.500 en el año 2010. De la misma forma, la proporción de embriones transferidos producidos *in vitro* incrementó de un 6,31% sobre el total de transferidos en el año 2001 al 36,52% en solo una década.

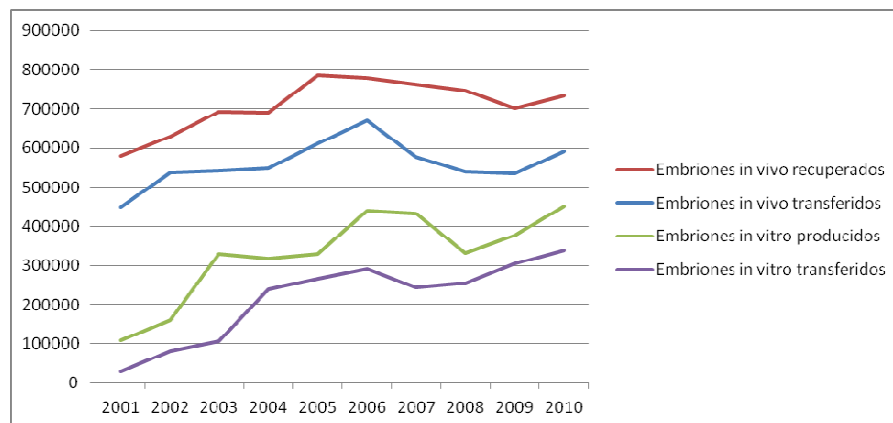


Tabla 1. Evolución de la producción de embriones (Datos IETS)

La explicación de este considerable aumento en el número de embriones transferidos en esos años se debe a las numerosas aplicaciones derivadas del desarrollo de la FIV. Así hay que destacar que la FIV ha contribuido a aumentar el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, ya que este procedimiento ha permitido obtener ovocitos en novillas de más de seis meses de edad, en vacas durante el

primer trimestre de gestación y a partir de las 2-3 semanas del posparto (Galli y col, 2003). Esta técnica no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de la hembra donante y evita la necesidad de utilizar gonadotrofinas. Además facilita el empleo de semen sexado, ya que puede usarse para fecundar los ovocitos *in vitro*, mientras que su aplicación en hembras sometidas a estimulación ovárica no permite obtener buenos resultados.

La FIV ha permitido también incrementar la eficacia de los procedimientos de selección mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de interés productivo y ha abierto la puerta para el empleo de otras biotecnologías como sería el caso de la obtención de ovocitos por aspiración transvaginal (OPU), la transferencia de núcleos procedentes de células somáticas (SNCT), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la clonación y la integración de transgenes bien sea por microinyección en embriones (Eyestone 1999; Behboodi y col 2001), por la transmisión de retrovirus (Chan y col 1998), por la clonación nuclear usando como donantes de núcleos células modificadas genéticamente (Chen y col, 2002; Brophy y col, 2003) o por la fecundación *in vitro* con el espermatozoides elaborado por la inserción de enzimas de restricción (Shemesh y col, 2000).

La FIV ha permitido obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis, BSE) y el aprovechamiento como reproductores de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con oligospermias severas, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital (Cainzos y col, 2008). Otra faceta muy interesante de esta técnica es que posibilita la producción de embriones con un coste muy reducido, lo que permite transferir embriones de razas especializadas en la producción cárnica en vacas de aptitud láctea no destinadas a la cría, bien por razones de selección genética o por causas sanitarias. Además, permite la utilización de los embriones para combatir determinadas formas de infertilidad, como lo son las derivadas de los trastornos de la ovulación, de los fracasos en la fecundación o asociadas con mortalidad embrionaria precoz. El empleo de

embriones de producidos *in vivo* en estas situaciones no sería posible por su elevado coste económico. La búsqueda de tratamientos alternativos para determinadas formas de infertilidad es indispensable en la actualidad ya que durante las últimas décadas se ha observado un notable descenso en las tasas de gestación en las vacas de elevada producción láctea (Stevenson, 2001; Washburn y col, 2002; López-Gatius, 2003). La transferencia de embriones producidos *in vitro* ha demostrado ser un procedimiento eficaz para mejorar las tasas de gestación en vacas expuestas a estrés térmico (Hansen y Block, 2004) y podría ser también útil para solventar problemas de infertilidad debidos a otras causas, como ya se ha comprobado en la especie humana. La transferencia de embriones independientemente de que sean producidos *in vivo* o *in vitro* implica un proceso previo de selección, de tal manera que solamente se transfieren aquellos embriones que logran evolucionar hasta las etapas de mórula o de blastocisto. Por lo tanto, la utilización de la transferencia de embriones permite solucionar los fracasos de la gestación atribuidos a la ausencia de ovulación, la liberación de ovocitos con escasa competencia para soportar el desarrollo debido a exceso o defecto de maduración, alteraciones en el transporte oviductal de los gametos o los cigotos. La eficacia de la transferencia de embriones para incrementar la tasa de preñez en una explotación de ganado vacuno dependerá de diferentes variables entre las que podemos destacar: la causa de la infertilidad (es decir, si es debida a problemas asociados con la ovulación, la fecundación o el inicio del desarrollo embrionario), del potencial de desarrollo de los embriones que se transfieren, y del nivel de fertilidad en el rebaño logrado mediante la utilización de la inseminación artificial (Hansen y Block, 2004).

La eficiencia de la técnica utilizada para producir embriones bovinos *in vitro* es todavía reducida, lo que dificulta su utilización a gran escala. Así, el porcentaje de ovocitos inmaduros, que una vez madurados y fecundados son capaces de evolucionar hasta embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%. Esta cifra refleja que el procedimiento utilizado para la producción de embriones *in vitro* no es capaz de reproducir los diferentes microambientes que existen *in vivo* dentro del aparato genital de la hembra. Además, las condiciones de cultivo repercuten negativamente sobre la calidad

de los embriones producidos *in vitro*, provocando que sea inferior a la de los obtenidos *in vivo* como consecuencia de que presentan diversas alteraciones morfológicas y de su expresión génica. Los embriones producidos *in vitro* son más oscuros y muestran una menor densidad por su mayor contenido citoplásmico de lípidos (Massip y col, 1995), están constituidos por un menor número de blastómeros, siendo esta reducción especialmente marcada a nivel de la masa celular interna (Rizos y col, 2002a), tienen una zona pelúcida más frágil (Duby y col 1997), un espacio perivitelino más reducido y se desarrollan a mayor velocidad (Thompson y col, 1998; Lonergan y col, 1999). Además, se ha comprobado que una elevada proporción de estos embriones presentan mixoploidia: células normales y células poliploides (Slimane y col, 2000; Viuff y col 2002). La comunicación intercelular está alterada, observándose una expresión anormal de las proteínas que conforman las uniones gap (Boni y col, 1999). Por último hay que señalar la existencia de alteraciones en la expresión génica (Nieman y Wrenzycki, 2000; Lazzari y col, 2002; Rizos y col, 2003) y una mayor presencia de células apoptóticas (Pomar y col 2005).

Todas estas alteraciones provocan una reducción de su potencial de desarrollo pre- y postimplantacional, determinado bajos porcentajes de gestación (30 a 40%), y una escasa resistencia a la criopreservación, lo que dificulta su conservación a largo plazo. Además, los embriones producidos *in vitro* manifiestan algunas diferencias que aparecen en el transcurso de la gestación y durante el desarrollo fetal. Así, se ha comprobado un incremento de la incidencia de mortalidad embrionaria y fetal, aparición de hidroalantoides y un alargamiento de la duración de la gestación (Young y col, 1998 y 1999). Algunos estudios demuestran que más del 30% de los terneros derivados de embriones producidos *in vitro* presentan un peso superior a los 50 Kg, independientemente de su raza (Kruip y den Daas 1997). Esta alteración ha sido denominada síndrome de exceso de volumen fetal, conocido a nivel internacional como LOS (Large Offspring Syndrome) y está asociada con diversas anomalías estructurales y funcionales, que incrementan el porcentaje de distocias por exceso de volumen fetal, disminuyen el vigor de los animales en el momento de su nacimiento y provocan un aumento de la mortalidad perinatal.

La producción de embriones *in vitro* es el resultado final de un procedimiento que consta de varias etapas claramente diferenciadas, de tal manera que todas y cada una de ellas repercuten en los resultados finales. Estas etapas pueden resumirse en cuatro: obtención y selección de los complejos cúmulo-ovocito, maduración *in vitro* (MIV), preparación de los espermatozoides y fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo de los cigotos resultantes hasta evolucionar a blastocistos (CIV).

## I. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS CÚMULO-OVOCITO (CCO)

El método utilizado para la recolección de los CCO y su correcta selección en función de su calidad, son factores determinantes del resultado final de la técnica utilizada para la producción de embriones *in vitro*.

### I.1. OBTENCION DE CCO A PARTIR DEL OVARIO

En la especie bovina es muy poco frecuente obtener los ovocitos a partir de los ovarios de vacas ovariectomizadas. Este procedimiento tiene un rendimiento muy bajo ya que el número de ovocitos obtenidos no justifica el coste del procedimiento. Además, requiere aplicar un tratamiento previo de estimulación ovárica, generalmente administrando FSH, y no permite volver a utilizar a la hembra como donante de ovocitos. Sin embargo, tiene la ventaja de que disponemos de toda la información relativa a la situación fisiológica de la donante, de su raza, edad, estado de lactación, nutrición, estado reproductivo.

Otra posibilidad, mucho más utilizada, es obtener los ovocitos a partir de los ovarios de animales sacrificados en un matadero comercial. Este método permite disponer de una gran cantidad de ovocitos de manera simultánea, por lo que resulta un muy útil para producir un gran número de embriones a bajo precio ya sea con fines investigadores o destinados a otros fines. Sin embargo, este procedimiento no permite garantizar la calidad genética de las hembras de procedencia o su estado sanitario (a menos que estas sean conocidas previamente), ni la situación fisiológica o metabólica de los animales.

Cuando se obtienen ovocitos a partir de animales sacrificados en el matadero es necesario tener muy presentes algunas variables que se ha comprobado que repercuten considerablemente en el resultado final: el tiempo transcurrido entre el sacrificio del animal y el inicio de la maduración de los ovocitos, la temperatura a la que se mantienen los ovarios durante este periodo, las técnicas de recuperación de los CCO de los ovarios y características del folículo que condiciona la calidad del ovocito.

#### **I.1.1. DURACIÓN DEL TRANSPORTE OVÁRICO Y TEMPERATURA A LA QUE SE MANTIENEN**

El tiempo que transcurre entre el sacrificio del animal y el inicio de la maduración de los ovocitos, así como la temperatura a la que se mantienen los ovarios durante este periodo son dos variables que afectan a los resultados finales. Diversos estudios indican que existe una relación inversamente proporcional entre la duración del periodo entre el sacrificio del animal y la aspiración de los folículos y el porcentaje de blastocistos obtenido (Shioya y col, 1988; Blondin y col 1997). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la capacidad de los ovocitos bovinos para soportar el desarrollo podría incrementarse cuando los ovarios son sometidos a un período de incubación antes de proceder a la recuperación de los ovocitos. Así, Blondin y col (1995) observaron que cuando los ovarios eran mantenidos durante 3-4 horas a 30 °C antes de realizar la aspiración folicular mejoraba significativamente la competencia de los ovocitos para soportar el desarrollo. Estos autores sugieren que durante este período de incubación se podría modificar el microambiente folicular generando unos cambios similares a los que acontecen en un folículo preovulatorio en las horas que preceden a la ovulación.

Cuando se evalúa el efecto de la temperatura de almacenamiento de los ovarios desde su obtención hasta su procesado en el laboratorio, los resultados indican que temperatura a la que se mantienen debe superar los 35° C para que los ovocitos conserven su competencia (Pollard y col, 1996).



### I.1.2. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA RECUPERACIÓN DE CCO

La técnica utilizada para recuperar los ovocitos a partir de ovarios obtenidos en el matadero debe cumplir dos requisitos: permitir obtener la mayor cantidad de complejos cúmulo-ovocito posible de cada uno de los ovarios utilizados y garantizar que los mismos conserven su calidad (citoplasma homogéneo y varias capas compactas de células del cumulo), para que puedan ser utilizados en la maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (Katska, 1984; Gonzalez y col 1992).

Una de las técnicas empleada es la disección de folículos antrales con un diámetro comprendido entre los 2 y 8 mm y su posterior ruptura controlada (Kruip y Dieleman, 1982; McNatty y col, 1984; Staigmiller y Moor, 1984). Este procedimiento implica el aislamiento de cada uno de los folículos del resto de tejido ovárico con la ayuda de tijeras y pinzas, y la posterior ruptura controlada de cada folículo liberando los. Este método permite recuperar un porcentaje CCO muy elevado (90-100%) y además son de muy buena calidad, ya que prácticamente no se alteran las células del cúmulo y permite seleccionar únicamente los folículos no atrésicos. En la especie ovina los folículos no atrésicos se pueden identificar por una serie de características morfológicas: su aspecto uniforme, translúcido y brillante, su extensa vascularización y la presencia en el interior del folículo de capa homogénea del estrato granuloso. Por el contrario, los folículos atrésicos presentan una apariencia mate, gris, opaca y están poco vascularizados (Moor y Trounson, 1977). Sin embargo, durante las primeras fases de atresia los folículos contienen CCO con mayor competencia para desarrollo que los que se encuentran en las fases de crecimiento o de meseta (Feng y col, 2007).

La principal limitación de esta técnica es que obliga a utilizar mucho tiempo para su ejecución.

Otros métodos diseñados como alternativas a la disección folicular son la maceración (Carolan y col, 1994) y la digestión enzimática con tripsina o colagenasa (Gordon, 1994; Arlotto y col, 1996). Estos procedimientos

simplifican y aceleran la recuperación de los ovocitos, pero alteran y reducen la calidad de los complejos cúmulo-ovocito.

El método más comúnmente empleado para la recuperación de CCO a partir de ovarios obtenidos en el matadero es la aspiración del contenido de los folículos antrales, procedimiento que consiste en la punción de la pared del folículo y la aspiración de su contenido utilizando una aguja unida a una jeringa (Leibfried y First, 1979; Xu y Greve, 1988) o a una bomba de vacío (Hashimoto y col, 1999; Ward y col, 2000). Este método es más simple y considerablemente más rápido que la disección (Gordon, 2003), lo que es particularmente importante cuando los embriones se producen con un interés comercial, pero tiene el inconveniente de que sólo permite recuperar los ovocitos de entre el 50 y 60% de los folículos aspirados (Katska, 1984), cifra sensiblemente inferior a la lograda mediante disección folicular. Además, la calidad de los ovocitos obtenidos es menor que la de los recuperados por disección folicular, debido a que la aspiración ocasiona la separación de las células del cúmulo que se encuentran más firmemente unidas a las de la granulosa. La presencia de estas células tiene una importancia decisiva para la maduración y la fecundación *in vitro* (Katska, 1984; Ahmed y col 2001).

Se han llevado a cabo numerosos trabajos con el fin de evaluar el impacto del diámetro de la aguja (de 18G a 22G), del tamaño de la jeringa (de 3 a 20 mL) y de la presión empleada con bombas de vacío (de 40 a 100 mm Hg), para tratar de disminuir los daños ocasionados sobre los complejos cúmulo-ovocito durante la aspiración. Fry y col (1997) demostraron que el número y la calidad de los CCO eran mayores cuando se empleaban agujas de 17G y una presión de aspiración de 55 mm de Hg. Cuando se incrementa la presión de aspiración se reduce la calidad de los CCO, que se atribuye a la eliminación parcial o total de las células del cúmulo, siendo esta proporcional a la presión utilizada.

Algunos autores sugieren la posibilidad de utilizar otra técnica conocida con el nombre de *slicing*, que consiste en realizar numerosos cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí a lo largo de toda la superficie ovárica, esta actuación garantiza la ruptura de los folículos ováricos y permite la recolección de CCO mediante el lavado del ovario. Esta técnica

permite incrementar el número de ovocitos obtenidos por cada uno de los ovarios tratados (Arlotto et al, 1990), pero su realización resulta muy laboriosa en cuanto e incrementa el riesgo de contaminación séptica de los ovocitos (Arav, 2001). El número de CCOs por ovario es tres veces superior al logrado mediante la aspiración, pero el tiempo necesario para completar el proceso es también tres veces mayor, por ello el número de CCO recuperados por unidad de tiempo es el mismo para ambos procedimientos, la única ventaja es que el número de ovarios necesario es sensiblemente inferior cuando se utiliza el slicing (Carolan y col, 1994). Sin embargo, un factor a tener en cuenta es que el porcentaje de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos recuperados mediante slicing duplica al logrado mediante aspiración (Vajta y col 1996).

La combinación de ambos procedimientos, una aspiración folicular preliminar seguida de un slicing no supone ninguna en términos de porcentaje de ovocitos recuperados y la calidad de los mismos (Gordon, 2003).

En 2001, Arav desarrolló una técnica que facilitaba la aspiración de los folículos corticales al permitir la visualización de los mismos mediante su transiluminación a través de la médula ovárica mediante la inserción de una varilla de Plexiglas a través de una pequeña incisión realizada en el hilio. Esta técnica denominada Transiluminación-aspiración ovárica (TAO), permitió incrementar en un 50% el número de CCO recuperados por ovario, ello se debe a que la iluminación central permite visualizar mayor número de folículos que la iluminación convencional. Esta técnica permite discriminar los folículos localizados en la región cortical en función de su tamaño, lo que no es posible cuando se utiliza el slicing, lo que condiciona la competencia de los ovocitos obtenidos, como comentaremos seguidamente.

### I.1.3. CARACTERÍSTICAS DEL FOLICULO QUE CONDICIONAN LA CALIDAD DEL OVOCITO

Numerosos trabajos han demostrado la existencia de una clara interacción entre el diámetro y morfología de los folículos y la calidad de los ovocitos que contienen. Así, los ovocitos recuperados a partir de folículos cuyo diámetro

supera los 6 mm presentan una mayor capacidad de desarrollo que los procedentes de folículos de un diámetro inferior (Loneragan y col, 1994a). Los datos obtenidos por Kubota y Yang (1998) (Tabla 2) sugerían una clara asociación entre el diámetro de los folículos y la competencia para el desarrollo de los ovocitos bovinos. Los CCO obtenidos a partir de los folículos de menor diámetro mostraban menor capacidad para soportar el desarrollo, lo que probablemente era consecuencia de su incompetencia citoplasmática (Kubota y Yang 1998).

Experimento	Diámetro folicular (mm)	No. de ovocitos	No. (%) divididos	Blastocistos (BL)	BL Eclosionados
FIV	5-8	77	59 (77) <sup>ab</sup>	40 (52) <sup>a</sup>	24 (31) <sup>a</sup>
	2-5	122	103 (84) <sup>a</sup>	56 (46) <sup>a</sup>	43 (35) <sup>a</sup>
	1-2	117	90 (68) <sup>b</sup>	30 (26) <sup>b</sup>	21 (18) <sup>b</sup>
	< 1	64	20 (31) <sup>c</sup>	7 (11) <sup>c</sup>	1 (2) <sup>c</sup>
ACT	5-8	86	78 (91) <sup>a</sup>	38 (44) <sup>a</sup>	6 (7) <sup>a</sup>
	2-5	113	98 (87) <sup>a</sup>	43 (38) <sup>ab</sup>	6 (5) <sup>a</sup>
	1-2	74	65 (88) <sup>a</sup>	22 (30) <sup>b</sup>	4 (5) <sup>a</sup>
	< 1	42	20 (48) <sup>b</sup>	6 (14) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
NT	2-5	90	76 (84) <sup>a</sup>	24 (27) <sup>a</sup>	-
	< 1	53	46 (87) <sup>a</sup>	6 (11) <sup>b</sup>	-

<sup>a,b,c</sup> Values within experiment with different superscript differ (P < 0.05).

Tabla 2. Tamaño folicular y desarrollo ovocitario (Kubota y Yang, 1998)

El porcentaje de blastocistos obtenido a partir de ovocitos madurados *in vivo* duplica al de lo madurados *in vitro* (Blanco y col, 2011) . También se ha comprobado que cuando los ovocitos proceden de folículos preovulatorios el porcentaje de blastocistos es dos veces superior al obtenido cuando se utilizan ovocitos procedentes de folículos con un diámetro comprendido entre 2 y 8 mm (Henriksen y col 1998). Todo esto indica que durante la capacitación de los ovocitos *in vivo* se producen importantes cambios moleculares que son consecuencia de los cambios a los que están expuestos los ovocitos desde el inicio del crecimiento folicular hasta que llega a ser un folículo preovulatorio (Van de Leemput y col, 1999; Hendriksen y col 2000; Dieleman y col, 2002).

Un estudio realizado por Van de Leemput y col (1998) mostró que los ovocitos procedentes de folículos preovulatorios con una elevada

concentración de estradiol tenían mayor competencia que los procedentes de folículos con un bajo nivel de estradiol. Además, Araki y col (1998) llegaron a establecer un valor de corte, 100 pg/ml de estradiol, por debajo del cual la competencia de los ovocitos disminuía significativamente.

Se ha comprobado la existencia de otros compuestos presentes en el fluido folicular cuyas concentraciones podrían resultar útiles para evaluar la calidad del ovocito, como es la progesterona. Ambas moléculas son secretadas por las células somáticas de los folículos y se acumulan en el fluido folicular. La atresia en los folículos se caracteriza por un descenso de los niveles de estradiol y un incremento de los de progesterona, mientras que en los folículos funcionales la situación es justo la contraria.

Los ovocitos adquieren su competencia gradualmente y se incrementa a medida que los folículos completan su desarrollo folicular, por lo tanto para optimizar los resultados obtenidos *in vitro*, deberíamos recoger y madurar los ovocitos procedentes de folículos maduros (Gandolfi et al, 2000). Los resultados obtenidos por Henriksen y col (1999) sugieren que los ovocitos podrían haber adquirido a su máxima competencia para el desarrollo *in vitro* cuando el diámetro folicular alcanza los 8 mm. Matchtkova y col (2004) obtuvieron resultados similares ya que estimaban que los ovocitos adquirirían la capacidad de desarrollo *in vitro* cuando los folículos habían alcanzado los 7 mm de diámetro.

La presencia de células atípicas en la granulosa folicular puede ser, también, un indicador de su menor calidad (Van den Hurk y col, 2000). Esta opinión está basada en su ausencia en los folículos de tamaño preovulatorio y su presencia, en gran número, en los folículos atrésicos. En un estudio realizado por Heleil y col (2000) se determinó la relación entre el diámetro folicular y las características morfológicas de las células del cúmulo y entre las características de la cromatina del ovocito y su competencia. Estos autores comprobaron que los ovocitos presentes en los folículos con un diámetro superior a los 5 mm eran mucho más homogéneos y se caracterizaban por contener en una mayor proporción cromatina intacta en los estadios de vesícula germinal (VG), que los folículos más pequeños. Sin embargo, Seneda y col (2000) analizaron el efecto

del diámetro del folículo en el porcentaje de ovocitos recuperados, la calidad de los mismos y su competencia para el desarrollo, comparando los ovocitos obtenidos mediante OPU con los procedentes de ovarios de matadero, y no fueron capaces de encontrar ninguna evidencia de que la calidad del ovocito y del embrión producido fuese distinta cuando los ovocitos procedían de dos categorías foliculares diferentes (<4 mm vs> 4 mm).

## **I.2. OBTENCIÓN DE CCO A PARTIR DE ANIMALES VIVOS**

La obtención de ovocitos mediante punción transvaginal guiada por ecografía (ovum pick up, OPU), fue descrita por Pieterse y col (1988). La facilidad con la que se lleva a cabo esta técnica en las hembras bovinas, el elevado número de complejos cúmulo-ovocito recuperados, su calidad y su capacidad para soportar el desarrollo embrionario, la han convertido en el método de elección cuando se actúa sobre hembras vivas de esta especie. Además, la utilización de este procedimiento permite el empleo de animales prepúberes como donantes de ovocitos (6-8 meses de edad) (Taneja et al, 2000), lo que implica a una considerable reducción del intervalo generacional. También permite emplear como donantes de ovocitos animales en estados fisiológicos muy diferentes: hembras cíclicas, acíclicas y en los dos primeros tercios de la gestación (Merton y col, 2003). Otra ventaja del procedimiento es la posibilidad de aprovechar como reproductoras las hembras que padecen desórdenes reproductivos causantes de infertilidad, cuyo origen no es genético (Galli et al, 2003), como es el caso de la obstrucción oviductal.

La principal desventaja de la técnica es su elevado coste, lo que determina que su uso solamente sea rentable cuando actuamos sobre animales de alto valor genético (Galli y col, 2001). Además, el número medio de ovocitos recuperados presenta grandes variaciones oscilando entre 3,3 (Santl y col 1998) y 6,8 (Hidalgo y col 2002).

### I.3. FACTORES INTRÍNSECOS DETERMINANTES DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LOS OVOCITOS OBTENIDOS

La capacidad del ovocito para madurar, ser fecundado, evolucionar hasta blastocisto, ser capaz de establecer la gestación y completar la misma hasta permitir el nacimiento de un ternero vivo, es una cuestión de notable importancia para la producción de embriones bovinos *in vitro* (Driancourt y col, 1998). Así, la calidad de los ovocitos viene definida por esta capacidad y se conoce con el nombre de competencia para desarrollo. Se han identificado numerosos factores capaces de influir en la competencia del ovocito, algunos resultan fácilmente identificables, mientras que otros no son evidentes hasta que tiene lugar la fecundación de los mismos.

#### a) Edad de la hembra donante.

Los estudios en los que se ha analizado la influencia de la edad de la hembra sobre la calidad de los ovocitos recuperados se han centrado preferentemente en los animales muy jóvenes y en los de edad avanzada. La disminución progresiva de la fertilidad humana, a medida que avanza la edad, es un fenómeno sobradamente conocido. Sin embargo, en el caso de la producción de embriones bovinos *in vitro*, nuestro interés se centra fundamentalmente en las hembras jóvenes, especialmente en las novillas prepúberes. La utilización de estos animales para obtener ovocitos permite acortar el intervalo intergeneracional y acelerar los procesos de mejora genética (Betteridge y col 1989). Las hembras recién nacidas muestran folículos antrales en sus ovarios y éstos contienen ovocitos que han completado su desarrollo, sin embargo los resultados obtenidos al utilizar estos ovocitos en la producción de embriones *in vitro* han sido decepcionantes (Duby y col, 1996; Gandolfi y col, 1996; Presicce y col 1996; Kelly y col, 1997; Khatir y col, 1997; Earl y col, 1998; Steeves y Gardner, 1999b; Steeves y col, 1999; Armstrong, 2001; Palma y col, 2001).

Se ha comprobado que los CCO procedentes de terneras son menos competentes para soportar el desarrollo que los procedentes de hembras adultas (Adulyanubap y col, 1998; Gandolfi y col, 2000). Revel y col (1995) demostraron que la fecundación y el porcentaje de divididos de los ovocitos

procedentes de terneras de 3 meses de edad eran muy similares a los obtenidos de vacas adultas, no obstante el porcentaje de blastocistos obtenidos era sensiblemente inferior (9-11%) a los procedentes de animales adultos (>20%). Algunos estudios indican que el problema se podría solventar de manera parcial mediante la incorporación del factor de crecimiento epidermal (EGF) al medio utilizado durante la maduración *in vitro* (Khatir y col, 1996a,b,c), debido a que dicho factor modifica el patrón de síntesis de nuevas proteínas en ovocitos de terneras, incrementando significativamente el porcentaje de blastocistos obtenido (Khatir y col, 1996a,b,c). Algunos estudios indican que hay diferencias significativas en la actividad metabólica y la síntesis de proteínas entre los CCO procedentes de las vacas y de las terneras (Gandolfi y col 1998), lo que podría ser el factor responsable de que los ovocitos procedentes de animales prepúberes presenten menor competencia para soportar el desarrollo.

El diámetro del ovocito tiene una marcada influencia en su capacidad para madurar hasta metafase II en las novillas, al igual que sucede en el caso de los ovocitos procedentes de hembras bovinas adultas, y se ha comprobado que los ovocitos de las terneras presentan un menor diámetro que los de las hembras adultas (Duby y col, 1995). Así, Majerus y col (1999) comprobaron que muy pocos de los ovocitos con un diámetro inferior a 120  $\mu\text{m}$  son capaces de completar la meiosis, incluso una gran proporción de ovocitos cuyo diámetro supera los 120  $\mu\text{m}$  no son capaces de madurar hasta metafase II.

La posible causa determinante de la baja competencia para el desarrollo de los ovocitos obtenidos a partir de las novillas, es su menor sensibilidad a los agonistas de la liberación de calcio (Damiani y col, 1996a, b; 1998). Así en un porcentaje significativamente elevado de los ovocitos procedentes de animales prepúberes no se producían las oscilaciones de calcio, que tienen lugar tras la penetración de los espermatozoides. Por otro lado, Levesque y Sirard (1994) demostraron que muchas de las proteínas presentes de las células del cúmulo en las vacas adultas estaban ausentes en el de las terneras. Estas proteínas podrían resultar de una importancia decisiva en el inicio de la cascada de eventos necesarios para el desarrollo normal de los embriones bovinos.



A pesar de esto, se ha logrado el nacimiento de terneros a partir de ovocitos procedentes de terneras prepúberes sometidas a estimulación hormonal, madurados *in vivo* (Armstrong y col, 1992) o *in vitro* (Kajihara y col 1991; Revel y col 1995). Algunos autores que han trabajado con ovocitos procedentes de animales prepúberes, han logrado resultados similares a los obtenidos con ovocitos procedentes de animales adultos, en cuanto a la maduración hasta metafase II (Armstrong y col 1992, Revel y col 1995), de ovocitos fecundados y segmentados (Mermillod y Saumande, 1992; Revel y col 1995) y de blastocistos (Armstrong y col 1994, Irvine y col 1993; Revel y col 1993), incluso, en algunos casos, los porcentajes de división y de blastocistos superaron a los obtenidos con los procedentes de animales adultos (Armstrong y col 1992).

#### b) Etapa del Ciclo ovárico

Otro de los factores que influyen sobre la competencia de los ovocitos es la etapa del ciclo en la que se encuentra la hembra, aunque generalmente no se tiene en cuenta en el momento de obtener los ovocitos (Leibfried y First, 1980; Fukui y col, 1987; Sirard y col, 1989 y 1992).

La capacidad de los ovocitos para reiniciar la meiosis *in vitro* y su competencia para soportar el desarrollo están relacionados con el diámetro del folículo, como hemos señalado anteriormente, pero también están condicionados por la etapa del ciclo estral en la que se encuentra la hembra y el grado de atresia folicular, que es consecuencia de la influencia de otros folículos ováricos, especialmente de los folículos dominantes (Pavlok y col, 1992; Lonergan y col, 1994; Machatkova y col, 1996, Hagemann, 1999).

Algunos trabajos apoyan la idea de que los ovocitos tienen mayor competencia para el desarrollo cuando proceden de ovarios que contienen un cuerpo lúteo y, por tanto, la hembra se encuentra en la fase luteal (Boediono y col 1995). Para ser más precisos, la mayor proporción de blastocistos se logra cuando los ovocitos son recuperados en hembras que se encuentran entre los días 14 y 16 del ciclo, cuando se comparan con los recogidos en los días 2, 7 a 9 o 19 a 20 (Machatkova y col, 1996).

La presencia de un folículo dominante en el ovario condiciona claramente el potencial de desarrollo de los ovocitos presentes en el resto de los folículos ováricos. El porcentaje de blastocistos obtenido fue sensiblemente superior cuando los ovocitos fueron obtenidos durante la fase crecimiento folicular, cuando se comparan con los logrados durante la fase de dominancia (Hagemann, 1999; Hagemann y col, 1999), siendo más evidente el efecto supresor ejercido por el folículo dominante durante la fase de no-crecimiento (Steenweg y col, 2000). El folículo dominante provoca un efecto inhibitorio sobre los folículos subordinados, lo que ha sido atribuido a la secreción de inhibina y de  $17\beta$ -estradiol (Matton y col 1981, Wolfsdorf y col 1997). Machatkova y col (2006) describieron que los ovocitos bovinos aumentan su competencia para el desarrollo cuando se incrementa el diámetro del folículo, independientemente de la fase de la oleada folicular en la que se encuentra el ovario. Johnson y col (2001) describen que los ovocitos son más competentes para el desarrollo cuando son los aspirados a partir de folículos grandes, que cuando proceden de otros de menor diámetro, independientemente de que se produzcan antes o después de la fase de selección del folículo dominante.

Sin embargo, es un hecho claro que el diámetro de los folículos y la población de los ovocitos recolectados, están sometidos a la influencia selectiva del folículo dominante, de manera que el potencial de desarrollo de los ovocitos recolectados de folículos grandes y pequeños es menor, pero no afecta a los folículos de diámetro intermedio. Cuando se determina el porcentaje de blastocistos obtenido a partir de ovocitos procedentes de folículos de diámetro medio recogidos durante la fase de dominancia folicular, se comprueba que no difiere significativamente de la conseguida a partir de ovocitos recolectados durante la fase de crecimiento folicular. Guilbault y col (1992) y Hagemann y col (1999) suponen que el efecto inhibitorio inducido por el folículo dominante está relacionado con el diámetro de los folículos subordinados. Así, la atresia de los folículos de diámetro intermedio, como consecuencia de la dominancia, no sería necesariamente perjudicial para la competencia de los ovocitos recolectados a partir de estos folículos. En este mismo sentido, se ha comprobado que el inicio de la atresia tiene un efecto positivo en la capacidad de desarrollo (Blondin y Sirard, 1995). Esto podría explicarse, en parte, por las similitudes

ultraestructurales observadas entre los ovocitos sometidos a premaduración y los obtenidos durante las etapas tempranas de la atresia (Assey y col 1995). A medida que progresa la atresia folicular se incrementa el grosor de la zona pelúcida, el diámetro del ovocito, la capacidad para soportar el desarrollo y en el porcentaje de ovocitos que sufren ruptura de la vesicular germinal (GVBD) tras 24 horas de cultivo (De Wit y col, 2000).

Blondin y Sirard (1995) demostraron que la capacidad de desarrollo de los ovocitos procedentes de folículos atrésicos, intermedios y poco atrésicos eran muy similares. Se ha determinado que a medida que aumentan los signos de atresia folicular, el porcentaje de blastocistos obtenidos va en aumento, a excepción de los ovocitos procedentes de folículos fuertemente atrésicos (Jewgenow y col, 1999; de Witt y col, 2000).

La interacción entre el diámetro folicular y la fase de la oleada de crecimiento folicular en la se encuentra el ovario influye sobre la eficiencia de la producción de embriones. A este respecto, el número de folículos de diámetro intermedio presentes en los ovarios es mayor durante la fase de crecimiento y por ello, la mayor proporción de los ovocitos obtenidos proceden de ellos. Durante la etapa de dominancia el número de folículos de diámetro intermedio es menor, por lo que los embriones proceden principalmente de ovocitos recuperados a partir de folículos pequeños, los cuales tienen un menor potencial de desarrollo que los ovocitos de folículos pequeños recuperados en la fase de crecimiento (Machatkova y col, 2006).

### c) Efecto de la Morfología Ovárica

Las características morfológicas de los ovarios bovinos permiten predecir el potencial de desarrollo *in vitro* de los ovocitos obtenidos a partir de los mismos (Varisanga y col, 1998). La presencia de un folículo dominante en uno o ambos ovarios afecta negativamente a la competencia de los ovocitos recolectados, y, así, los ovocitos de mayor calidad podrían obtenerse a partir de folículos antrales de los ovarios que no contienen un folículo dominante (Shen y Lee, 1999)

#### d) Condición corporal y situación nutricional

El estado nutricional de las hembras influye considerablemente sobre las concentraciones circulantes de muchos metabolitos y hormonas y también influye en la composición y la presencia de factores de crecimiento en el fluido folicular, oviducto y útero (Webb y col 2007).

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes sistemas para evaluar la condición corporal como procedimiento para estimar la situación nutricional del ganado, y numerosos autores han analizado la relación entre la condición corporal de las hembras donantes y la competencia para el desarrollo de los ovocitos (ver revisiones de McEvoy, 1999; McEvoy y Robinson, 2002). Así, se ha descrito que los animales con una condición corporal de 1, en una escala de 0 a 5, presentan una proporción de ovocitos de buena calidad significativamente menor que los animales con puntuaciones de 2-3 (López y col, 1996a,b; Fazio y col, 1999). Del mismo modo algunas evidencias sugieren que la situación nutricional puede afectar a la expresión de algunos genes muy importantes para el desarrollo en la especie bovina (Wrenzycki y col, 1999, 2000a). Así, cuando las hembras nulíparas reciben dietas muy ricas en energía la calidad de los ovocitos disminuye sensiblemente, observándose bajas tasas de desarrollo pos-fecundación (Nolan y col 1998; Sinclair y col, 2003).

No solamente influye el estado nutricional, sino que la composición cuantitativa y cualitativa de la dieta también tienen una considerable importancia sobre el número de ovocitos obtenidos y la calidad de los mismos (Yaakub y col, 1999a,b). Se ha comprobado que los folículos antrales de tamaño medio (de 4-8 mm de diámetro) son muy sensibles a la presencia de una concentración excesiva de nitrógeno degradable en el interior del rumen, que podría determinar altas concentraciones de urea en plasma y fluido folicular, lo cual afectaría a la competencia de los ovocitos presentes en su interior (Sinclair y col, 1999, 2000). Del mismo modo se ha comprobado que la concentración de ácidos grasos en la ración altera la composición de ácidos grasos de las células del cúmulo, granulosa y de los ovocitos, lo cual podría repercutir en la competencia del ovocito (Kim y col, 2001).

**e) Estado reproductivo de la donante**

Las vacas gestantes puede producir un mayor número de ovocitos de alta calidad que las hembras cíclicas, situación atribuida a las elevadas concentraciones circulantes de progesterona y la aparición de sucesivas oleadas de crecimiento folicular (Gordon, 2003).

**f) Factores propios del animal**

Los datos obtenidos en un estudio realizado en Irlanda sugieren que el mérito genético de ganado lechero puede afectar a la calidad de sus ovocitos (Snijders y col, 2000). Las vacas de alto valor genético produjeron ovocitos de menor calidad que sus compañeras de rebaño con un valor genético inferior. Estos hallazgos podrían tener relevancia para conocer el motivo de qué la tasa de fecundidad sea más reducida en los rebaños lecheros de mayor rendimiento productivo (Gordon, 2003)

**g) Factores de origen medioambiental**

Existen numerosas evidencias que demuestran que el estrés térmico puede alterar el desarrollo de los ovocitos y su calidad. Esta situación es especialmente marcada en el ganado vacuno lechero, debido a su mayor sensibilidad al estrés térmico como consecuencia de la alta demanda metabólica asociada a la lactación. En estos animales la capacidad de los ovocitos para ser fecundados y soportar posteriormente el desarrollo embrionario está disminuida durante los períodos del año en los que se producen situaciones de estrés térmico (Zeron y col 2001; Al-Katanani y col 2002; Sartori y col 2002). Así, una elevada temperatura ambiental en los 10 días que preceden al momento del celo induce un descenso de la fertilidad (Al-Katanani y col 1999). También se ha podido comprobar una reducción en la producción de esteroides por parte de las células de la teca y de la granulosa en las vacas expuestas a estrés térmico durante 20-26 días (Roth y col 2001a). Estos mismos investigadores comprobaron que la recuperación de la fertilidad que se produce durante el otoño puede verse acelerada mediante la eliminación de los folículos reclutados durante el verano, aspirando los folículos con un diámetro comprendido entre 3-7 mm de durante cuatro ciclos estrales consecutivos (Roth y col, 2001b),.

Los mecanismos a través de los cuales el estrés térmico compromete la función ovocitaria incluyen alteraciones en el crecimiento y la función folicular (Roth y col 2000), en la secreción de esteroides (Wolfenson y col 1997; Roth y col 2001a; Ozawa y col 2005) y en la expresión génica (Argov y col 2005). Uno de los efectos del estrés térmico en ganado lechero es provocar un incremento del número de folículos de tamaño mediano y pequeño, cuyo reclutamiento podría ser consecuencia del descenso de la concentración de inhibina y del incremento de la secreción de FSH (Roth y col 2000). El ovocito permanece susceptible a los daños ocasionados por el estrés térmico durante todo el período de crecimiento preovulatorio, y los daños ocasionados durante este período parecen implicar la generación de ROS, ya que los efectos ocasionados por el estrés térmico, tanto *in vivo* (Roth y col 2008) como *in vitro* (Lawrence y col 2004) fueron atenuados mediante la adición de antioxidantes. La apoptosis juega un papel crítico en los efectos ocasionados por el estrés térmico sobre la maduración de los ovocitos bovinos. Una parte importante de los complejos cúmulo-ovocito expuestos a elevadas temperaturas (aproximadamente un 15-30%) desarrollan apoptosis, tal y como se ha determinado por técnicas de TUNEL (Roth y Hansen 2004a,b, 2005; Soto y Smith 2009). Así, cuando los ovocitos son madurados *in vitro* a una temperatura elevada, es posible la inhibir la apoptosis mediante un inhibidor de la caspasa (Roth y Hansen 2004a), la esfingosina 1-fosfato (Roth y Hansen 2004b,2005) o el péptido BH4 (Soto y Smith 2009), manteniendo la competencia de los ovocitos para ser fecundados y soportar el inicio del desarrollo.

#### **h) Estimulación hormonal de la funcionalidad ovárica**

En algunos casos se han utilizado tratamientos hormonales con FSH y/o eCG para estimular la actividad ovárica antes de la recogida de los ovocitos con la finalidad de incrementar el número de folículos con un diámetro apropiado para garantizar la presencia de un ovocito plenamente competente (Chaubal y col, 2006, Sendag y col, 2008). Estos mismos tratamientos pueden administrarse a las hembras prepúberes, permitiendo obtener unos ovocitos con un comportamiento respecto a la maduración y fecundación similares a los

procedentes de hembras adultas (revisado por Duby y col 1996). Aunque los porcentajes de blastocistos obtenidos con ovocitos de hembras prepúberes estimuladas previamente varía ampliamente de unos grupos a otros (ver revisión por Izquierdo, 1996).

Los principales inconvenientes de la administración de tratamientos hormonales de estimulación ovárica son la gran variabilidad en la respuesta y la posibilidad de que una parte de los ovocitos resultan activados antes de su recogida (Moor y col 1985; Kumar y col 1990).

#### **I.4. SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS**

La selección de los complejos cúmulo-ovocito se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea.

El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar (Sato y col, 1990; Fair y col, 1995), de tal forma que cuando el diámetro es inferior a 120  $\mu\text{m}$ , no han completado aun la fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad de reiniciar la meiosis. Este hecho ha sido confirmado por Lechniak y col (2002), al comprobar que los ovocitos de menor diámetro tienden a seguir unas rutas anómalas durante la maduración meiótica que ocasionan anomalías durante el proceso de maduración y podría explicar la reducida capacidad de desarrollo de los embriones derivados de los ovocitos pequeños.

Diversos autores han tratado de establecer una relación entre el aspecto del citoplasma y la competencia del ovocito (Younis y col, 1989; Momozawa y Fukuda, 1995; Nagano y col, 1999). Así, se ha comprobado que los ovocitos que presentan un ooplama oscuro muestran un buen potencial para el desarrollo, mientras que los que presentan un citoplasma pálido tienen una baja densidad de orgánulos y escaso potencial de desarrollo. Por otra parte, cuando el ooplama es negro, los ovocitos están envejecidos y tienen un potencial para soportar el desarrollo muy reducido (Nagano y col, 2006).

Los ovocitos que se encuentran rodeados por un cúmulo compacto, formado por varias capas de células, presentan mayor capacidad para madurar, ser fecundados y soportar el desarrollo embrionario temprano, que los que

carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiata (Xu y col, 1986; Lonergan y col, 1994; Momozawa y Fukuda, 1995; Stojkovic y col, 2001). Ello parece ser debido a que la evolución del ovocito está condicionada por la asistencia que le brindan las células del cúmulo a través de estímulos paracrinos y de las uniones gap. Las células del cumulo son un complejo metabólico para el ovocito, gracias a la vía de comunicación aportada por las uniones gap heterologas (Li y col 2000; Shimada y col 2001), y ejercen un papel modulador de los efectos de las hormonas y los factores de crecimiento (Byskov y col 1997; Shimada y col 2003), durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Esto ha sido documentado también en otras especies (Petr y col 1989; Apa y col 1994; Shimada y Terada 2002; Yamashita y col 2003). A pesar de haberse comprobado que algunos ovocitos pueden completar la meiosis en ausencia de células del cúmulo, su capacidad para ser fecundados y para originar embriones viables se ve sensiblemente reducida (Geshi y col, 2000; Ali y col, 2005).

Estas características estructurales han permitido elaborar diversos sistemas de clasificación de los CCO basados en la evaluación subjetiva visual, que permiten homogeneizar el trabajo y los resultados de los distintos laboratorios. El número de categorías de los diferentes sistemas de clasificación suele variar entre 3 y 6, y cada clase o categoría suele correlacionarse con una capacidad de desarrollo. Así por ejemplo, Wurth y Kruip (1992) clasificaron los CCO en tres categorías, en función exclusivamente de la apariencia del cúmulo, (ver tabla 3) y excepto para CCO obtenidos de folículos marcadamente atrésicos, los CCO de clase B fueron los que permitían lograr porcentajes de blastocistos mucho más elevadas que los de la clase A. De manera similar Blondin y Sirard (1995) encontraron una mayor tasa de desarrollo *in vitro* de los CCO de su Clase 3 (aquellos que muestran signos de una incipiente expansión en las capas exteriores del cúmulo y con una ligera granulación del ooplasma), comparado con las clasificaciones morfológicamente mejores (Clase 1 y 2) o peores (Clases 4-6).



Clasificación	Características
<b>Clase A</b>	Cúmulo brillante y compacto
<b>Clase B</b>	Cúmulo ligeramente expandido y oscuro
<b>Clase C</b>	Fuerte expansión y degeneración de las células del cúmulo

Tabla 3. Clasificación morfológica de los CCO (Wurth y Kruij, 1992)

Hawk y Wall (1994) realizaron una clasificación mucho más funcional, limitando el número de grados de calidad para los ovocitos destinados a la maduración *in vitro* a tres grupos, ya que consideran que un excesivo análisis de los ovocitos prolonga excesivamente el periodo de tiempo necesario para clasificarlos y retrasa su introducción en el medio de maduración. En este sistema de clasificación, tuvieron en cuenta las características del cúmulo y también las del citoplasma.

Por su parte, Laurincik y col (1996) describieron una técnica de clasificación basada en la densidad de la corona radiata, como método no invasivo para la selección de CCO. Los datos recogidos en este trabajo indicaron que los CCO cuya corona radiata presentaba una densidad similar a la del resto del cúmulo eran los menos adecuados para la producción de embriones *in vitro*.

Otra herramienta que podría ser utilizada para la selección y clasificación de los ovocitos en función de su capacidad para soportar el desarrollo es la expresión génica. Algunos autores sostienen la utilidad de definir cuál son los marcadores genéticos que permiten predecir la competencia de los ovocitos bovinos para soportar el desarrollo embrionario, ello permitiría elaborar medios de maduración y cultivo más apropiados. Así, Calder y col (2001) describieron diferencias en la expresión de los genes que codifican el receptor para PGE2 entre grupos de CCO de distintas calidades, ello permitiría disponer de una herramienta capaz de predecir la calidad del ovocito.

## II. MADURACIÓN DEL OVOCITO

### II.1. MADURACIÓN IN VIVO

El ovocito es una célula dotada de unas características muy singulares: elevada especialización, carece de la capacidad de multiplicarse, su población es escasa y no se renueva, y su progresión a la siguiente etapa evolutiva está condicionada por la presencia de ADN exógeno procedente de un espermatozoide.

La maduración del ovocito supone el final de un largo proceso de diferenciación celular que comprende diversos cambios estructurales en el núcleo y citoplasma, así como cambios de naturaleza molecular. Dichos cambios están regulados por numerosos factores, algunos aun desconocidos, que determinarán la formación de un óvulo con capacidad para ser fecundado y soportar el desarrollo embrionario temprano. Esta capacidad, definida bajo el término de competencia para el desarrollo, se adquiere de forma progresiva en el transcurso de la ovogénesis y la foliculogénesis, completándose durante el periodo periovulatorio (Eppig, 2001, Liu y Aoki 2002, Liu y col 2003).

Por tanto, la maduración del ovocito puede ser dividida en dos etapas: un largo periodo inicial, durante el cual el ovocito crece y madura en el interior de un folículo en crecimiento, y un corto periodo final que se completa entre el reinicio de la meiosis y la ovulación. La primera de estas etapas tiene una duración de varias semanas o meses y supone la adquisición gradual de una gran parte de la maquinaria necesaria para soportar el desarrollo embrionario temprano (Eppig y Downs, 1984).

#### II.1.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

En las hembras de los mamíferos la ovogénesis se inicia al comienzo del desarrollo fetal, de forma que se ha asumido tradicionalmente que la población final de ovocitos quedará establecida poco después del nacimiento, sin que se produzca la posterior diferenciación de nuevos ovocitos (Picton y col, 1998; Driancourt, 1991, 2001; Fair, 2003). No obstante, Johnson y col (2004) han

demostrado que el ovario de los ratones contiene una línea de células madre germinales capaces de generar nuevos ovocitos durante la vida postnatal.

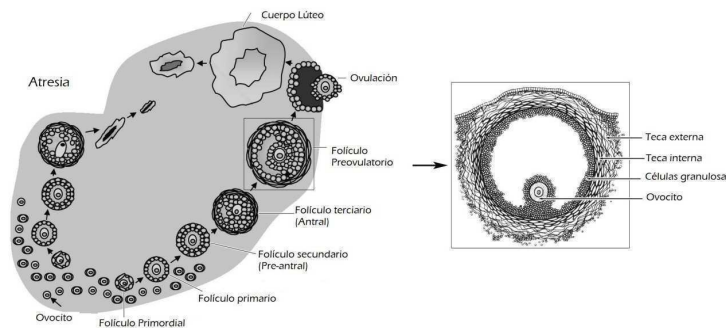


Figura 1. Representación esquemática del ovario. En la derecha, ilustración de un folículo antral con las respectivas capas celulares. Adaptado de Drummond y col. (2002).

La ovogénesis se inicia durante la gastrulación, momento en el que se forman las células germinales primordiales, que se multiplicarán activamente a través de sucesivas divisiones mitóticas. Estas células precursoras migran, tanto en machos como en hembras, a las crestas genitales originando las células germinales (Wassarman, 1988). La diferenciación de células sexuales, ya sea hacia espermatozoides u ovocitos, se producirá posteriormente durante el desarrollo y está regulada por factores secretados en el tejido somático gonadal (Matsui, 1998; Tsang y col, 2001). Una vez completada la diferenciación del ovario, las células germinales primordiales proliferan quedando conectadas por puentes intercelulares y reciben el nombre de ovogonias (Picton y col, 1998). Éstas replican su ADN e inician la meiosis, transformándose en ovocitos primarios (Gosden y Bownes, 1995), atraviesan las etapas de leptotene, zigotene y paquitene de la profase I, hasta detenerse en el estadio de diplotene. Durante esta etapa los ovocitos muestran una sensibilidad extrema, por lo que una gran parte de los mismos degenera (van den Hurk y Zhao, 2005).

El inicio de la meiosis coincide con el comienzo de la foliculogénesis. El ovocito se rodea de una capa simple de células somáticas, dando lugar a los folículos primordiales (Gosden y Bownes, 1995). Estas células somáticas, precursoras de las células de la granulosa, son de origen mesotelial y/o mesonéfrico (van den Hurk y col, 1995) y disponen ya de la capacidad de secretar esteroides (Juengel y col, 2002). Los folículos primordiales pueden

permanecer durante periodos muy prolongados en esta fase, en la especie humana hasta 4 ó 5 décadas. La activación de los folículos primordiales se caracteriza por un cambio en la morfología de las células de la granulosa, transformándose de aplanadas a cúbicas, y por el inicio del crecimiento del ovocito. Estos cambios determinan la transformación de los folículos primordiales en primarios. La activación de los folículos primordiales está regulada por una compleja interacción entre factores estimuladores e inhibidores de origen local y/o sistémico (por revisión ver: Van den Hurk y Zhao, 2005). El intercambio de señales moleculares entre el ovocito y las células que lo rodean resulta esencial durante el crecimiento y la diferenciación de ambos. Así, el ovocito es responsable del crecimiento folicular y de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, mientras que las células de la granulosa resultan indispensables para el crecimiento, la diferenciación y la maduración del ovocito (Matzuk y col, 2002).

Cuando las células de la granulosa proliferan generando un segundo estrato, dan lugar a los folículos secundarios o preantrales (Driancourt, 1991). Al mismo tiempo comienzan a secretar diferentes glicoproteínas, que al asociarse formarán la zona pelúcida. Esta estructura brindará protección primero al ovocito y más tarde al embrión, y desempeñará un papel destacado durante la fecundación (Van den Hurk y Zhao, 2005). Los folículos primordiales, primarios y secundarios aparecen en el ovario fetal de las hembras bovinas a los 90, 140 y 210 días post concepción, respectivamente (Russe, 1983). Durante esta etapa el folículo presenta en esta especie un diámetro de 150  $\mu\text{m}$  y el ovocito de 60  $\mu\text{m}$ . El citoplasma del ovocito sufre una clara transformación apareciendo nuevos orgánulos (ribosomas, mitocondrias, gránulos de glucógeno, proteínas, lípidos), al tiempo que se reorganizan los previamente existentes.

Las células que rodean al ovocito continúan proliferando e inician su diferenciación, apareciendo el cúmulo y las tecas, al tiempo que se forma una cavidad entre las células de la granulosa con contenido líquido, lo que supone la transición a folículo terciario o antral. El fluido presente en el interior del antro, constituye una fuente de sustancias moduladoras y reguladoras, que derivan del plasma sanguíneo y de actividad secretora de las células foliculares. El aumento de la vascularización y de la permeabilidad de los vasos localizados

en la pared folicular, produce un aumento del tamaño del antro y del diámetro folicular. Cuando el folículo alcanza los 4 mm de diámetro adquiere la capacidad de responder a los estímulos desencadenantes del reclutamiento, pudiéndose incorporar a una oleada de crecimiento folicular (Van den Hurk y Zhao, 2005).

En la especie bovina el crecimiento folicular se produce en oleadas y en cada una de ellas se suceden las etapas de reclutamiento, selección y dominancia. El crecimiento inicial de los folículos antrales es independiente del estímulo gonadotrófico, pero a partir del momento en que alcanzan un diámetro de 4 mm se hacen sensibles a las gonadotropinas. Así al inicio de cada oleada, un grupo de folículos (5 a 10 en la vaca) comienzan su crecimiento de manera gradual y regular, como respuesta a la elevación de la concentración sérica de FSH. La aparición de actividad aromatasa en las células granulosas permite la secreción de estrógenos a partir de los andrógenos producidos por las células de la teca, estimuladas por la LH. En las especies monovulares (vaca, yegua, humana, etc), solamente se transformará en folículo dominante uno de los inicialmente reclutados y continuará su crecimiento y diferenciación, adquiriendo la capacidad de ovular. Algunos datos adjudican al factor de crecimiento tipo insulina (IGF) el papel regulador de la selección del folículo dominante. El IGF actúa sinérgicamente con la FSH para promover la síntesis de estradiol en los folículos antrales, que a su vez ejerce un retrocontrol negativo en la secreción de FSH de modo que acentúa su dominancia (Fortune y col, 2004). Las células de la granulosa del folículo antral seleccionado incrementan su contenido en receptores para la LH y FSH, volviéndose más sensibles y reactivas al efecto de las mismas. Así, la LH facilita que en muy pocos días el folículo seleccionado aumente su diámetro, adquiriendo así un tamaño muy superior a los restantes y alcanzando un diámetro final de 15 a 20 mm. El folículo dominante contiene un ovocito en íntima asociación con un grupo compacto de células de la granulosa, dicha asociación se conoce con el nombre de complejo cúmulo ovocito (CCO). Este complejo está bañado por el fluido folicular y conectado con las restantes células de la granulosa dispuestas en la pared interna del folículo (Van den Hurk y Zhao, 2005).

En las hembras bovinas, se producen entre dos y tres oleadas sucesivas de crecimiento folicular en el transcurso de cada ciclo estral. Sin embargo, la

ovulación solamente se producirá cuando la presencia del folículo dominante coincida con la regresión del cuerpo lúteo. Tanto los folículos subordinados de cada onda folicular, como los folículos dominantes que no ovulan sufrirán atresia.

El ovocito tiene la capacidad de reiniciar la meiosis de manera espontánea durante una parte importante de la foliculogénesis, pero dicha situación no se produce, indicando la existencia de un factor inhibidor. Esta sustancia, denominada factor inhibidor de la meiosis (OMI), todavía es desconocida, aunque se han propuesto diversos candidatos (TGF- $\beta$ , AMH, activina, inhibina, follistatina). Las dificultades para su identificación pueden ser consecuencia de su extrema labilidad. El AMPc parece jugar también un papel destacado en el bloqueo de la meiosis (Downs y col, 1993). El OMI procede de la actividad secretora de las células que conforman la pared folicular, tal y como ha sido demostrado utilizando cultivos de ovocitos con fragmentos de dicha pared (Richard y Sirard, 1993) o con primocultivos de células de la teca y de la granulosa (Kotsuji y col, 1994). Así, se ha comprobado que la teca y la granulosa cooperan para mantener el bloqueo meiótico, siendo más eficaz cuando ambos tipos celulares están presentes. Se sospecha que el OMI podría proceder de las células de la teca, estimuladas por las gonadotropinas, y ser modificado o transmitido al ovocito por las células de la granulosa a través de las células del cúmulo o por el fluido folicular.

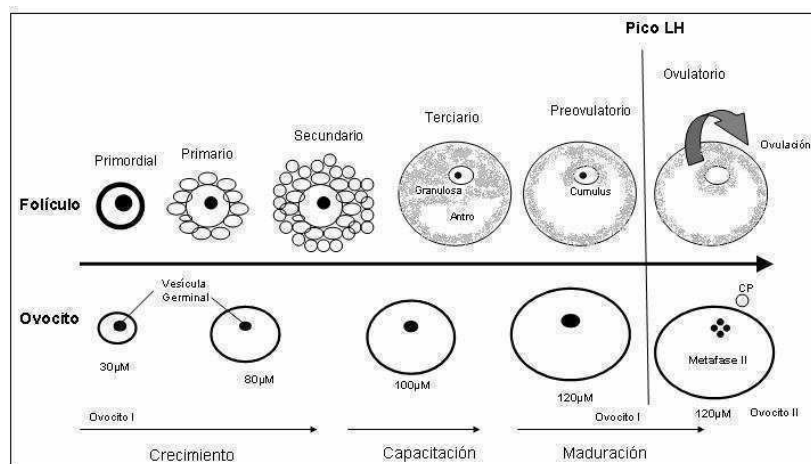


Figura 2. Representación esquemática del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis (Mermillod y col, 1999).

### II.1.2. MEIOSIS OVOCITARIA

La meiosis es un prerrequisito para la reproducción sexual en la mayoría de las especies animales. Este proceso es exclusivo de las células germinales y su objetivo es la formación de gametos haploides genéticamente equilibrados. El proceso de meiosis tiene dos momentos en los cuales se detiene: alrededor del nacimiento y en la ovulación y solo se completa totalmente al producirse la fecundación del ovocito. En los mamíferos la meiosis consta de dos divisiones denominadas Meiosis I y II, divididas a su vez en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase, indicando con los términos I y II su correspondencia a una u otra división (Klug y Cummings, 1986; Kleinsmith y Kish, 1988):

- **Profase I:** la profase de la meiosis I es la etapa de mayor duración y, en la mayoría de los mamíferos, se inicia durante la vida fetal. Se puede dividir en cinco subfases denominadas: leptotene, cigotene, paquitene, diplotene y diacinesis. Durante la fase de leptotene los cromosomas comienzan a condensarse y se hacen visibles. En el cigotene el complejo sinaptonémico, estructura similar a una "cremallera de proteínas" que sirve para alinear y unir los cromosomas homólogos, comienza a desarrollarse (Heyting, 1996). En esta fase se inicia, también, el apareamiento o sinapsis cromosómica. Durante el paquitene (Fig. 3.3), los cromosomas se encuentran totalmente vinculados y forman un bivalente que permite la recombinación genética entre los cromosomas homólogos (Roeder, 1990). En el período de diplotene, el complejo sinaptonémico desaparece, pero los cromosomas permanecen conectados entre sí en las zonas de recombinación denominadas los quiasmas. El proceso de meiosis se detiene en esta fase (primera parada meiótica) y el ovocito entra en la etapa diacinesis, que generalmente es un período muy prolongado y se caracteriza estructuralmente por la presencia de una vesícula germinal (GV), que persiste hasta el etapa preovulatoria cuando se activa mediante la descarga de LH. Aunque la meiosis se detiene en la fase de diacinesis, durante este intervalo se produce el crecimiento de los ovocitos y una gran actividad sintética (Tsafriri, 1978). La larga profase termina cuando los cromosomas se condensan progresivamente, la membrana nuclear se disuelve, un proceso llamado rotura de la vesícula germinal (GVBD) y se inicia la metafase I.

- **Metafase I:** se forma el huso mitótico, los centrómeros de los cromosomas homólogos se unen a las fibras del huso, que se originan en los polos opuestos de la célula, y se alinean en la placa ecuatorial.

- **Anafase I:** los cromosomas homólogos (pero no cromátidas hermanas) de cada tétrada se separan y se mueven hacia cada uno de los polos del huso.

- **Telofase I:** Esta etapa lleva a la finalización de la primera división meiótica y culminará con la expulsión del primer cuerpo polar

- **Metafase II:** las cromátidas pares se asocian con los microtúbulos del huso y migran a la región ecuatorial del mismo. En la mayoría de los mamíferos, el ovocito entra en la segunda etapa de detención de la meiosis. La ovulación suele producirse en esta fase.

- **Anafase II:** La segunda división meiótica se completa en el oviducto después de la penetración del espermatozoide. Las cromátidas pares se separan unas de otras y son atraídos por los polos opuestos del huso.

- **Telofase II:** La última fase de la meiosis finaliza con la expulsión del segundo cuerpo polar.

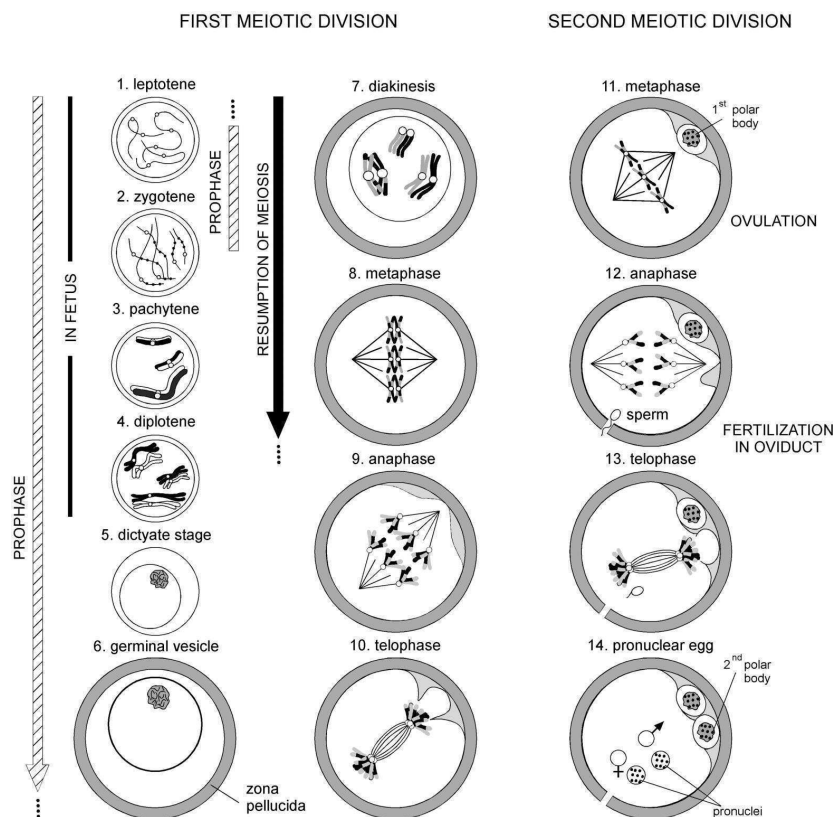


Figura 3. Ilustración esquemática de las etapas de la meiosis en los ovocitos de los mamíferos.

Adaptado de Tsafirri (1978).



Tiempo*(h)	Estado meiótico	Descripción morfológica
0	VG	Núcleo intacto. Membrana nuclear presente. A veces el nucleolo. Cromatina a veces condensada
6-10	GVBD	Desaparición de la vesícula germinal. Desintegración de la membrana nuclear. Visualización de los primeros cromosomas bivalentes.
10-12	DIACINESIS	Los cromosomas están condensados en el lugar del núcleo
12-16	METAFASE I	Los cromosomas se colocan ordenadamente en la zona ecuatorial formando el huso acromático
16-18	ANA.TELOFASE I	Los cromosomas se segregan hacia los polos del huso acromático
19-24	METAFASE II	Cromosomas condensados en el segundo huso acromático y presencia del primer corpúsculo polar

\* Tras el pico de LH

Tabla 4. Descripción morfológica de los estadios meióticos durante la maduración de los ovocitos bovinos (Kruip y col, 1983)

### II.1.3. INTERACCIONES DEL OVOCITO CON LAS CÉLULAS FOLICULARES.

Los ovocitos de los mamíferos crecen y evolucionan manteniendo un contacto íntimo e interdependiente con las células somáticas adyacentes. Tras la formación del antro las células de la granulosa se diferencian en dos tipos celulares distintos por sus características estructurales y funcionales: las células de la granulosa y las del cúmulo. Las células de la granulosa recubren la pared interna del folículo y tienen una función secretora principalmente esteroidogénica. Las segundas forman una estrecha asociación con el ovocito mediante proyecciones citoplásmicas que atraviesan la zona pelúcida y establecen uniones gap con el ovocito, por ello, la asociación se denomina complejo cúmulo-ovocito (CCO)(Albertini y col, 2001). Las células del cúmulo y el ovocito mantienen una comunicación bidireccional a través de las uniones gap y mediante señales paracrinas (Dong y col, 1996; Simon y col, 1997). (Figura 1).

Durante mucho tiempo se consideraba que el ovocito actuaba de forma pasiva en su relación con las células somáticas del folículo. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el ovocito desempeña un papel central en la regulación folicular, jugando un papel crítico en la regulación de la

ovogénesis, la tasa de ovulación y la fecundidad (Eppig, 2001; Gilchrist y col, 2004; McNatty y col, 2004; Gilchrist y Thompson, 2007). El ovocito secreta una diversos factores de crecimiento denominados OSFs, que regulan la actividad de las células del cúmulo y de la granulosa. Este hecho fue demostrado inicialmente por el grupo de trabajo de Nalvandov (el-Fouly y col 1970; Nekola y Nalbandov, 1971) e ignorado durante dos décadas, hasta que diversos estudios posteriores realizados *in vitro* demostraron la capacidad del ovocito para regular la actividad funcional de las células del cúmulo y de la granulosa (Buccione y col, 1990; Salustri y col, 1990a,b; Vanderhyden y col, 1990). Posteriormente se demostró la existencia de dos compuestos pertenecientes a la superfamilia del Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), el factor de crecimiento-transformación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética del hueso 15 (BMP15), que son necesarias para el inicio de la foliculogénesis y actúan durante la regulación de la diferenciación de las células del cúmulo y de la granulosa (Eppig y col, 1997; Li y col, 2000) y en la regulación de su actividad (Elvin y col, 1999; Joyce y col, 2000; Otsuka y col, 2001; Gilchrist y col, 2008).

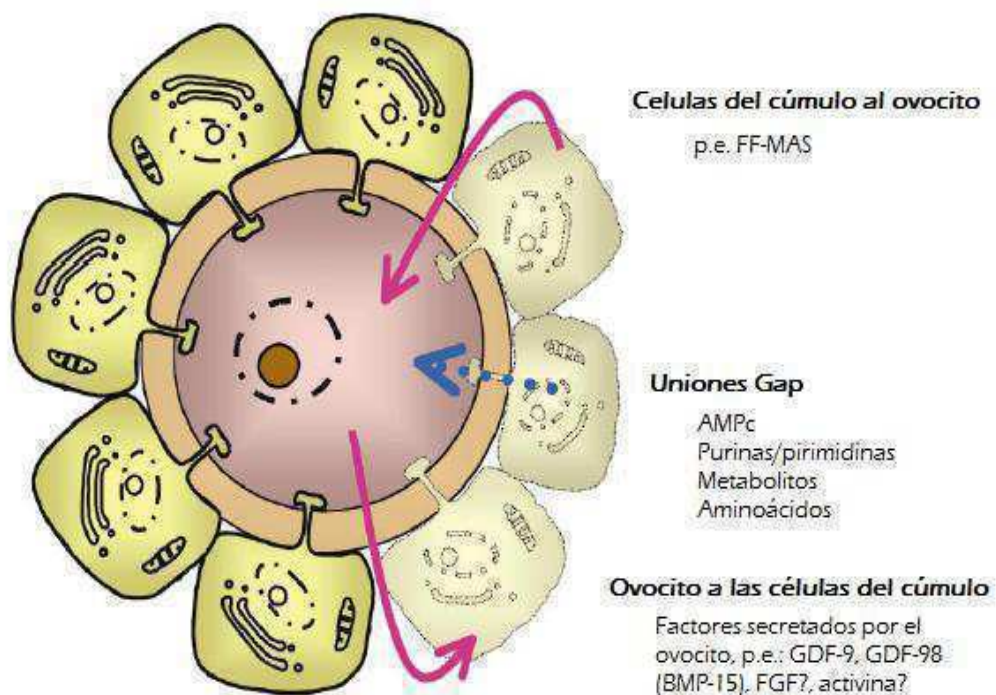


Figura 4. Comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo

Las células del cúmulo juegan, también, un papel crítico durante la maduración meiótica. Así, los procesos citoplásmicos transzonales comienzan a

separarse de la superficie del ovocito en el momento del reinicio de la meiosis y cuando se completa la metafase I la comunicación existente a través de las uniones gap se rompe de forma definitiva. Posteriormente, las células del cúmulo producen una gran cantidad de ácido hialurónico, que determina la mucificación y expansión del cúmulo (Chen y col, 1990). No obstante, estas células mantienen algún tipo de comunicación con el ovocito, puesto que su eliminación antes de la fecundación afecta a la penetración espermática y al posterior desarrollo embrionario (Zhang y col, 1995; Fatehi y col, 2002). En la especie bovina, las células del cúmulo intervienen durante la fecundación atrayendo y atrapando los espermatozoides (Cox y col, 1993; Chian y col, 1996), facilitando la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la penetración (Cox y col, 1993; Fukui, 1990; Younis y Brackett 1991; Chian y col, 1995) o evitando el endurecimiento precoz de la zona pelúcida (Downs y col, 1986; Katska y col, 1989).

La matriz extracelular mucoelástica que une a las células del cúmulo tras su expansión resulta esencial para su adhesión a los cilios del epitelio distal del oviducto, facilitando su captación y posterior transporte hacia la luz oviductal (Talbot y col, 2003).

La morfología de las células del cúmulo ha sido utilizada para seleccionar a los ovocitos destinados a la maduración *in vitro* (Shioya y col, 1988; Madison y col, 1992; Lonergan y col, 1994; Goud y col, 1998) y el grado de expansión del cúmulo se relaciona con la calidad del ovocito postmaduración, dado que las condiciones de cultivo favorables para la maduración suelen determinar, también, la expansión del cúmulo (Eyestone y de Boer, 1993, Choi y col, 2001). No obstante, existe bastante controversia en cuanto a la relación entre el grado de expansión del cúmulo y la competencia del ovocito (Ali y Sirard 2002, Luciano y col, 2004).

#### II.1.4. EL FLUIDO FOLICULAR.

El fluido folicular constituye el ambiente bioquímico que rodea al ovocito durante su crecimiento y diferenciación (Edwards, 1974; Chang y col, 1976). El fluido folicular tiene una gran variedad de funciones: bloqueo de la meiosis (McNatty 1978), protección frente a la proteólisis, extrusión durante la ovulación

(Espey y Lipner 1994), estimula la motilidad y la reacción acrosómica (Dell'Aquila y col 1997, Rodriguez y col 2001, Wang y col 2001) y ejerce un efecto amortiguador frente a condiciones adversas (Gosden y col 1988). El antro folicular es un compartimiento avascular, separado del estroma ovárico por la pared folicular que constituye la barrera "hemato-folicular" (Okuda y col, 1982; Bagavandoss y col, 1983).

Este fluido es un trasudado procedente del plasma, pero, además, contiene diversos componentes específicos originados de la actividad secretora y metabólica de las células foliculares (Gérard y col, 2002) y su composición varía de manera sustancial a lo largo de las distintas etapas del crecimiento folicular.

El fluido folicular contiene una gran variedad de sustancias: electrolitos, proteínas, enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas proteicas y esteroides, sustratos energéticos y otros factores de naturaleza desconocida. El conocimiento de la composición del fluido folicular podría contribuir al diseño de medios de maduración mejor adaptados a las necesidades de los ovocitos durante este periodo y por ello vamos a comentar algunas de las características relativas a la composición de este fluido.

El fluido folicular contiene cloruro, calcio, magnesio, zinc, cobre y fosfato inorgánico, en concentraciones similares a las observadas en el plasma y en el suero (Gosden y col, 1988). Sin embargo, los niveles de sodio y potasio son más elevadas, lo que demuestra la existencia de sistemas de transporte activo (Schuetz y Anisowicz, 1974; Gosden y col, 1988).

El contenido total en proteínas es inferior al existente en el suero, representando un 75% del mismo, y no varía significativamente en función del tamaño folicular. Este menor contenido en proteínas es debido a que las tienen un peso molecular superior a 250.000 son incapaces de atravesar la barrera hemato-folicular (Andersen y col, 1976). Sin embargo, la permeabilidad de esta barrera se incrementa a medida que progresa el crecimiento folicular, lo que determina que cuanto mayor es el diámetro del foliculo mayor es, también, su contenido en proteínas de alto peso molecular.

En tercer lugar, el fluido folicular contiene diversas enzimas y su cantidad aumenta durante la evolución folicular. Entre ellas destacan: la lactato deshidrogenasa, la ATPasa, las transaminasas y la fosfatasa alcalina (Stallcup, 1970; Caucig y col., 1971). Además, contiene hialuronidasa, endopeptidasa y alagenasa, enzimas que desempeñan un papel destacado en el momento de la ovulación (Zachariae y Jensen, 1958; Rondell, 1970).

El fluido folicular contiene glucosa y lactato y sus niveles varían en función del tamaño folicular, así durante las primeras etapas la concentración de glucosa es inferior a la observada en el suero, mientras que la de lactato es superior (Leroy y col, 2004), pero al incrementarse el tamaño del folículo la concentración de glucosa aumenta, mientras que la de lactato disminuye (Leroy y col, 2004). La glucosa juega un importante papel en el metabolismo intrafolicular, puesto que constituye la principal fuente de energía, siendo utilizada en anaerobiosis para la producción de lactato (Leese y Lenton, 1990; Boland y col, 1994; Rabiee y col, 1997, 1999).

Los niveles de triglicéridos también están condicionados por el tamaño folicular, disminuyendo a medida que se incrementa el diámetro del folículo. Así, en los folículos de menor tamaño sus niveles superan a los presentes en el suero, mientras que en los de mayor tamaño son significativamente inferiores (Leroy y col, 2004), lo que sugiere que están condicionados por procesos metabólicos locales. Además, la concentración de triglicéridos en el fluido folicular se mantiene constante y es independiente de las fluctuaciones ocasionadas por la situación metabólica del animal o los cambios en su dieta (Wehrman y col, 1991). Los triglicéridos presentes en el fluido folicular pueden servir como una fuente de energía alternativa, puesto que las células cultivadas *in vitro* los utilizan. Sin embargo, los ovocitos y los embriones cultivados en un medio que contiene triglicéridos muestran una gran acumulación de lípidos (Kim y col, 2001, Abe y col, 2002).

Los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) son similares a los del suero y no se modifican en función del tamaño del folículo. La concentración intrafolicular de colesterol representa el 42% de la sérica y su valor se incrementa con el tamaño folicular. El colesterol intrafolicular está ligado a

lipoproteínas de alta densidad, puesto que la fracción fijada a las de baja densidad no es capaz de atravesar la barrera hemato-folicular (Bauchart, 1993).

En los mamíferos el fluido folicular contiene hormonas esteroides y proteicas. Los niveles de FSH y LH son similares o ligeramente inferiores a los observados en el suero (Fortune y Hansel, 1985), mientras que la cantidad de estradiol presente en los folículos preovulatorios bovinos es bastante elevada (1 µg/ml) en el momento de la descarga preovulatoria de LH (Dieleman y col, 1983). Sin embargo, dicha concentración se reduce notablemente al cabo de 6 h coincidiendo con la rotura de la vesícula germinal (Dieleman y col, 1983).

Para finalizar, se ha identificado la presencia de diversos factores de crecimiento, entre los que destaca el IGF-1 (Hammond y col, 1985; Spicer y col, 1988).

#### II.1.5. CONDICIONES FÍSICAS EXISTENTES EN EL INTERIOR DE LOS FOLÍCULOS.

La temperatura del interior de los folículos preovulatorios es entre 1,5 y 2° C inferior a la del estroma ovárico (Grondahl y col, 1996; Hunter y col, 2000), aunque no se conoce el mecanismo responsable de esta situación, ni de sus implicaciones funcionales. Algunos autores la atribuyen a la escasa vascularización folicular, a la elevada presencia de líquido en el antro o a la existencia de reacciones endotérmicas en el interior del folículo (Hunter y Einer-Jensen, 2005). La reducción de la temperatura podría ejercer un efecto beneficioso durante la maduración citoplásmica de los ovocitos, ya que las temperaturas elevadas afectan negativamente a diversos orgánulos celulares y en especial a la química de las proteínas (Hunter y Einer-Jensen, 2005).

Otro factor a considerar es la cantidad de oxígeno disuelto en el líquido folicular, que varía de forma notable oscilando entre el 3,0 y el 5,5% (Van Blerkom y col, 1997). El contenido en oxígeno no guarda correlación alguna con el tamaño del ovocito, su grado de madurez o su capacidad para ser fecundado. No obstante, si que existe una elevada correlación con su capacidad para alcanzar la etapa de 6-8 células, de tal forma que un 79 % de los ovocitos procedentes de folículos con un alto contenido en oxígeno alcanzaron esta etapa del desarrollo, mientras que sólo lo lograron el 42 % de los procedentes

de folículos pobremente oxigenados (Van Blerkom y col, 1997). Además, los ovocitos procedentes de folículos con bajo contenido en oxígeno presentaron defectos en el número de cromosomas, en la organización del huso mitótico y en la estructura citoplásmica (Van Blerkom y col, 1997).

Todos estos datos indican que el conocimiento de la fisiología de los folículos ováricos en desarrollo puede contribuir de forma significativa a mejorar la eficacia de los procedimientos utilizados durante la maduración *in vitro*.

#### II.1.6. MADURACIÓN DEL OVOCITO.

Tal y como hemos señalado previamente, la maduración del ovocito es un proceso largo y complejo que comprende la maduración nuclear, citoplásmica y molecular. Estos procesos pueden producirse de manera independiente, pero solamente permitirán la adquisición de la competencia para el desarrollo cuando se desarrollen de manera sincronizada.

Los ovocitos primarios de mamífero se encuentran detenidos en el estadio de diplotene de la primera división meiótica. Cuando una hembra alcanza la madurez sexual y, como respuesta a la descarga preovulatoria de LH se reactiva la meiosis, iniciándose así la **maduración nuclear**. Esta situación también puede producirse de manera espontánea cuando un ovocito es extraído de su ambiente folicular. En ambas circunstancias se reanuda la meiosis desde la profase I, produciéndose un cambio morfológico, caracterizado por el plegamiento y posterior disolución de la envoltura nuclear, que se denomina rotura de la vesícula germinal (VGBD). De forma paralela tiene lugar la condensación de la cromatina y la desaparición del nucleolo, lo que provoca el cese de la transcripción. El reinicio de la meiosis se corresponde con la transición desde la fase G2 del ciclo celular a la fase M, la última fase S tuvo lugar en el ovario fetal al concluir el periodo de división de las ovogonias antes de diferenciarse en ovocitos. Como toda transición G2/M, está regulada por el factor promotor de la maduración (MPF), una proteína compleja caracterizada como un heterodímero compuesto por la proteína p34cdc2 y la ciclina B1 (Levesque y Sirard, 1996). Después de la activación del MPF tiene lugar la organización de los microtúbulos formando el huso mitótico y aparece la placa metafásica. La anafase y la telofase se completan con rapidez y el núcleo del

ovocito evoluciona inmediatamente hasta metafase II, al tiempo que tiene lugar a la expulsión del primer corpúsculo polar. En la especie bovina, los ovocitos adquieren la capacidad para iniciar la maduración nuclear cuando su diámetro es superior a 110  $\mu\text{m}$  y se encuentran alojados en un folículo cuyo diámetro supera los 3 mm (Fair y col, 1995).

En la mayor parte de los mamíferos el ovocito se encuentra en metafase II en el momento de la ovulación, situación en la que permanecerá hasta la entrada del espermatozoide o la activación partenogenética (segundo bloqueo de la meiosis). El bloqueo en metafase II es consecuencia de la actuación de un factor citostático (CSF) (Masui, 1990), de naturaleza desconocida, aunque se asocia con la actividad del proto-oncogen c-mos (p39mos) (Hirao y Eppig, 1997). Cuando el espermatozoide penetra en el citoplasma del ovocito se completa la segunda división meiótica y se produce la expulsión del segundo corpúsculo polar (Anderson, 1991).

La maduración del citoplasma no está definida con tanta claridad como la maduración meiótica, puesto que, además de los cambios morfológicos, implica cambios funcionales que no son apreciables mediante el microscopio. Los primeros cambios, relacionados con la maduración citoplásmica, se producen algunos días antes de la descarga preovulatoria de LH, momento en el que se interrumpe la síntesis de ARNm y de las proteínas, debido a que la condensación del nucleolo y la depleción de ribosomas modifica la maquinaria implicada en la transcripción y translación (Hyttel y col, 1986; 1989). En una segunda etapa tiene lugar la redistribución de los orgánulos citoplásmicos. Los gránulos corticales migran a la periferia de la célula, formando una monocapa irregular dispuesta en las proximidades de la membrana plasmática (Cran y Cheng, 1986). Estos gránulos corticales contienen enzimas hidrolíticas y representan una forma especial de los lisosomas. Una vez producida la fecundación liberarán su contenido enzimático al espacio perivitelino, modificando la estructura de la zona pelúcida para evitar la polispermia (Hoodbhoy y Talbot, 1994). Además, se produce la redistribución de las mitocondrias, localizándose en la región perinuclear y algunas modificaciones del citoesqueleto y de la membrana plasmática (Hyttel y col, 1989).



La maduración molecular es, de los tres, el proceso más desconocido puesto que los cambios asociados con él no son visibles a nivel ultraestructural. No obstante, sabemos que en los días previos a la ovulación se produce la transcripción de ARNm (Hunter y Moor, 1987), la síntesis de proteínas (Sirard y col, 1989) y la modificación de algunas de éstas (Levesque y Sirard, 1995). Estos cambios resultan imprescindibles para el desarrollo del futuro embrión durante las etapas previas a la activación de su genoma y su posterior evolución hasta blastocisto (De Sousa y col, 1998).

La síntesis de proteínas, durante esta etapa de maduración molecular, podría estar asociada con la regulación de los niveles citoplásmicos de glutatión (Racowsky, 1991). Ésta proteína desempeña un papel clave en la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas, prerequisite indispensable para la descondensación de la cromatina espermática y la formación del pronúcleo masculino (Perrault y col 1984). Al estar bloqueada la síntesis de glutatión durante las primeras etapas de la maduración *in vitro*, el citoplasma de los ovocitos, cuyo núcleo se halla en Metafase II, es incapaz de estimular la descondensación del núcleo del espermatozoide. Ello indica que la síntesis de glutatión en etapas tempranas de la maduración resulta imprescindible para que se produzca la fecundación de forma correcta (Perrault y col 1988). Rieger y Luskutoff (1994), al estudiar los cambios en la actividad metabólica de los ovocitos bovinos durante la maduración *in vivo*, demostraron que el metabolismo oxidativo aumentaba a lo largo del proceso, siendo la vía principal para de producción de energía durante éste período. La maduración también implica una serie de cambios en la transcripción y síntesis de proteínas, así como modificaciones postranslacionales de las mismas (Moor y Gandolfi, 1987). Existen numerosas evidencias de que algunas de las proteínas sintetizadas durante esta etapa persisten en las primeras etapas del desarrollo embrionario, por lo tanto cuando su síntesis no se produce de manera correcta, el ovocito no evolucionará a un embrión normal tras la fecundación (Moor y Gandolfi, 1987).

Otros factores sintetizados entre la fase de GVBD y la Metafase II, que resultan indispensables para la posterior fecundación son el factor de crecimiento del pronúcleo masculino (*male pronucleus growth factor*, MPGF) y

el factor de desarrollo del pronúcleo espermático (*sperm pronucleus development factor*, SPDF) (Yanagimachi, 1981).

Algunos autores señalan, también, una etapa de maduración de la zona pelúcida (ZP). La zona pelúcida es una envoltura externa del ovocito, formada principalmente por glucoproteínas, cuya composición es específica para cada especie. Este hecho evita la penetración de la misma por espermatozoides procedentes de otra especie (revisado por Betteridge, 1995). También es responsable de la inducción de la reacción acrosómica en el espermatozoide y del bloqueo de la polispermia (Crozet y Dumont, 1984). Aunque la zona pelúcida se sintetiza durante el crecimiento del ovocito, la capacidad de ser reconocida y penetrada por un espermatozoide se adquiere con posterioridad (revisado por Thibault y col, 1987), durante la maduración. Algunas de estas modificaciones consisten en el desarrollo de múltiples poros en la cara externa de la zona pelúcida y su ocupación por proteoglicanos secretados por las células del cúmulo, que contribuirán a la penetración espermática (revisado por Plachot y Mandelbaum, 1990).

#### II.1.7. COMPETENCIA DEL OVOCITO

Este concepto ha surgido como consecuencia del desarrollo de los procedimientos para la producción de embriones *in vitro*, y hace referencia a la capacidad del ovocito inmaduro para reanudar la meiosis y proseguirla hasta metafase II (competencia meiótica), iniciar la segmentación tras la fecundación, completar el desarrollo embrionario hasta blastocisto (competencia para el desarrollo), dar lugar a una gestación a término y producir un ternero sano (Sirard y col, 2006). Por lo tanto, este concepto permite definir las propiedades funcionales adquiridas por el ovocito durante sus etapas finales de diferenciación, que serán imprescindibles para soportar el desarrollo posterior (Duranthon y Renard, 2001; Sirard y col, 2006) y es la base que permite definir la calidad del ovocito. De la misma manera, la calidad embrionaria de un blastocisto viene definida por su capacidad para establecer el inicio de la gestación y que se complete hasta el nacimiento de un ternero vivo y normal.

De acuerdo con esta definición, la única forma de valorar la competencia del ovocito sería recurrir a la fecundación *in vitro* y la posterior transferencia de

los embriones resultantes (Sirard y col, 2003). Sin embargo, resulta evidente que no existe la posibilidad de transferir todos los embriones producidos *in vitro* a animales receptores para evaluar la calidad de los ovocitos y de los blastocistos obtenidos en cada ensayo. Además, determinar la calidad de los “mejores” embriones presentes en un lote o tratamiento no es indicativo de la calidad del conjunto (Bavister, 1995). Por lo tanto, se usan otros indicadores de la calidad ovocitaria como es el caso de las tasas de división y la producción de blastocistos y la supervivencia de los embriones a la criopreservación como indicador de calidad embrionaria. (Lonergan y col 2001). De esta manera es posible testar todos los componentes de un tratamiento.

Llegados a este punto, hay que tener presente que el porcentaje de blastocistos obtenido tiene un valor relativo, en cuanto a su capacidad para predecir la competencia para el desarrollo de los ovocitos, puesto que las alteraciones inducidas durante el periodo de cultivo pueden alterar el metabolismo celular o modificar la expresión de algunos genes, cuyos efectos se manifestarán durante el desarrollo postimplantacional, neonatal e incluso durante la vida adulta (Duranton y Renard, 2001; Ludwig y col, 2001; Lane y Gardner, 2003).

La primera propiedad que adquieren los ovocitos durante la maduración es la capacidad para reiniciar la meiosis, apareciendo una vez que han alcanzado un diámetro mínimo, cifrado en la vaca entre 110 y 120  $\mu\text{m}$ , y se produce antes de la formación del antro (Fair y col, 1995). A partir de este momento los ovocitos reinician la meiosis al ser extraídos del folículo, sin que sea necesario utilizar ningún agente estimulante (Edwards, 1965). Por ello, se considera que la reanudación de la meiosis es consecuencia de la eliminación de algún inhibidor folicular cuya naturaleza es desconocida (Richard y Sirard, 1996). No obstante, otros autores consideran que la competencia meiótica refleja la presencia y activación de algunas señales moleculares implicadas en su regulación. Así podría indicar la existencia de una cantidad suficiente de ciclina B (Hue y col, 1997) y la puesta a punto de la capacidad de los fosoinositoles para inducir la liberación pulsátil de calcio (Lefèvre y col, 1997). En algunas especies la capacidad para evolucionar hasta metafase I y metafase II no se

adquieren de forma simultánea, lo que indicaría que cada uno de estos procesos está regulado por unas moléculas diferentes (Sirard y col, 1998).

La capacidad para iniciar la segmentación es prácticamente automática e intrínseca en todos los ovocitos bovinos que han completado su crecimiento. Puede producirse en ausencia de fecundación como respuesta a un estímulo activador (metanol, corriente eléctrica). Cuando se analizan los presuntos cigotos que no han iniciado la segmentación a las 36 horas de la fecundación, se puede comprobar que en la mayoría de los casos no han sido fecundados y son muy pocos los que muestran en su citoplasma espermatozoides cuyos núcleos no se han descondensado (Sirard y col, 2006). Esta situación es diferente en el ratón, especie en la que la capacidad de los ovocitos para activarse e iniciar la segmentación se adquiere con posterioridad a la competencia meiótica (First y col, 1988).

La capacidad para soportar el desarrollo embrionario durante la primera semana y evolucionar hasta blastocisto es una propiedad clave, que se utiliza en muchos laboratorios como indicador de la competencia del ovocito. En la mayor parte de los embriones que no alcanzan esta etapa, la diferenciación se detiene en el momento de la activación del genoma embrionario, que en la especie bovina coincide con el cuarto ciclo celular (Barnes y First, 1991). Esto podría indicar que los ovocitos incompetentes carecen de la capacidad de promover la activación del genoma embrionario. Esta situación se observa en algunas condiciones fisiológicas, concretamente en las hembras prepúberes, cuyos ovocitos muestran una tasa de maduración nuclear idéntica a las adultas, pero los porcentajes de blastocistos producidos son significativamente inferiores (Khatir y col, 1996c). Durante la maduración citoplásmica se produce la acumulación de proteínas y ARNm, que probablemente serán responsables de la activación del genoma embrionario. A pesar de los numerosos esfuerzos realizados para mejorar las condiciones de cultivo de los embriones bovinos, el porcentaje de blastocistos obtenido no supera el 30-40% y solamente se ha logrado incrementar estas cifras utilizando ovocitos madurados *in vivo* procedentes de folículos cuyo crecimiento ha sido controlado utilizando protocolos de estimulación ovárica (Blondin y col, 2002). En la actualidad, se considera que el ambiente folicular que rodea al ovocito durante los días

previos a la ovulación, resulta decisivo para la adquisición de la competencia para el desarrollo (Sirard y col, 2006).

La comunicación bidireccional establecida entre el ovocito y las células del cúmulo resulta imprescindible para la adquisición de la competencia. Las células del cúmulo participan en la regulación del proceso, captando los estímulos generados por las gonadotrofinas y transformándolos en un estímulo positivo para la maduración. En la actualidad se ha generado una amplia discusión en relación a la vía utilizada para la transmisión de este estímulo y a la molécula responsable. En este sentido, se barajan dos posibles alternativas, que no son excluyentes: una ruta paracrina mediada por receptores y una ruta directa mediante la transmisión de señales a través de las uniones gap (Downs y col, 2006). En un estudio realizado en ratones, a los que se les administró gonadotrofina coriónica humana (hCG), Park y col (2004) simularon los cambios morfológicos y bioquímicos que se producen como respuesta a la descarga preovulatoria de LH. En estas condiciones las células de la granulosa de la pared folicular expresan tres proteínas (anfiregulina, epiregulina, betacelulina), de forma transitoria, relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y tan solo de una de ellas en el CCO. Cuando los CCO fueron sometidos a maduración *in vitro* en un medio que contenía estos tres factores se produjo la maduración meiótica y la expansión del cúmulo. Por lo tanto, estos factores paracrinicos, junto a otros, como el AMPc, podrían actuar como mediadores de los cambios foliculares que acontecen en respuesta a la descarga preovulatoria de LH.

## II.2. MADURACIÓN *IN Vitro*

Los procedimientos de maduración *in vitro* permiten obtener ovocitos maduros sin la necesidad de recurrir a la estimulación ovárica con gonadotrofinas. Esta técnica implica la extracción de los complejos cúmulo-ovocito de los folículos antrales y su posterior cultivo hasta que alcanzan la metafase II. Cuando las condiciones de cultivo utilizadas durante esta etapa son muy desfavorables se alteran tanto la maduración nuclear como la citoplásmica, lo que impide que se produzca la fecundación. Sin embargo, cuando el sistema

empleado tiene pequeñas deficiencias sus efectos no se manifiestan hasta el inicio del desarrollo embrionario temprano y en algunos casos solamente son apreciables con claridad después de la implantación.

En la mayor parte de las especies analizadas, se ha comprobado que los ovocitos madurados *in vitro* tienen menor competencia para el desarrollo que los madurados *in vivo* (Farin y col, 2001; Yang y col, 2001; Combelles y col, 2002; Dieleman y col, 2002; Holm y col, 2002). Este hallazgo puede ser fácilmente explicado por las grandes diferencias existentes entre ambos procesos. Cuando se realiza la maduración *in vitro* los CCO se obtienen a partir de folículos antrales con un diámetro de 4 a 8 mm, por lo que los ovocitos no han completado la etapa final de maduración intrafolicular y por tanto no han adquirido su plena competencia para el desarrollo. Además, el reinicio espontáneo de la meiosis, como respuesta de la extracción de los ovocitos de su ambiente folicular, supone la activación de sistemas de control diferentes a los que intervienen tras la descarga preovulatoria de LH (Gilchrist y Thompson, 2007). Durante la maduración *in vivo* los ovocitos permanecen de 4 a 5 días en el interior de un folículo antral, que es el tiempo que tarda en incrementarse el diámetro folicular desde los 4 a los 15 mm. Por el contrario, los ovocitos utilizados para la maduración *in vitro* se obtienen a partir de folículos de 4 a 8 mm, lo que determina que no se haya completado esta maduración final. Este hecho repercute en el porcentaje de blastocistos obtenidos *in vitro* (Lonergan y col, 2003). Así, se ha comprobado que los ovocitos procedentes de los folículos de mayor tamaño (>6 mm), tienen más probabilidades de producir blastocistos, que los obtenidos de folículos de menores dimensiones (Iwata y col, 2004).

El reinicio espontáneo de la meiosis supone el bloqueo de la transcripción y la rotura de las uniones gap establecidas entre el ovocito y las células del cúmulo (Thomas y col, 2004). Esta situación priva al ovocito de una etapa de preparación decisiva para la adquisición de la competencia para el desarrollo. Por ello, diversos investigadores han tratado de inducir una etapa de premaduración, retrasando o bloqueando temporalmente la maduración nuclear, facilitando el mantenimiento de las uniones gap entre el ovocito y las células del cúmulo, completándose la maduración citoplásmica y molecular.

En la especie bovina se han realizado numerosos intentos para bloquear temporalmente la meiosis mediante el cultivo con células de la teca y de la granulosa, modulando los niveles de AMPc (Luciano y col, 2004), utilizando reguladores del ciclo celular como la butirolactona (Hasimoto y col, 2002b) hipoxantina (Eppig y col, 1985) y otros aditivos (Sirard y First, 1988). Sin embargo, los resultados no han sido los esperados, puesto que en unos casos la duración del bloqueo inducido resulta excesivamente breve y en otros el bloqueo es tan drástico que resulta irreversible. Por ello, la identificación de la estructura química y el mecanismo de acción el OMI permitiría desarrollar un método adecuado para bloquear la meiosis *in vitro*.

Durante la maduración *in vitro* intervienen diferentes variables que podemos controlar: composición del medio de cultivo, temperatura y atmósfera gaseosa y duración del periodo de maduración, junto con otras de naturaleza desconocida.

#### II.2.1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE MADURACIÓN.

Los medios más frecuentemente utilizados para la maduración *in vitro* de los ovocitos son medios complejos. Estos fueron diseñados para cultivar células somáticas y tejidos durante periodos prolongados. En el caso concreto de la especie bovina, el más habitual es el TCM-199, que ha permitido obtener porcentajes de blastocistos más elevados que los logrados con otros medios (Fukui y col, 1991; Bavister y col, 1992; Rosenkrans y col, 1993; Carolan y col, 1995; Keskinetepe y col, 1995; Keskinetepe y Brackett, 1996; Lonergan y col, 1996; Steeves y col, 1999; Hasler, 2000). Sin embargo, este medio no parece ser el más apropiado para las necesidades complejas y dinámicas de los ovocitos durante la maduración. Además, al tratarse de un medio complejo, contiene una enorme variedad de sustancias lo que dificulta el estudio de las necesidades de los ovocitos bovinos durante su proceso de maduración. Por ello, cada día es más frecuente recurrir a medios simples: SOF (Tervit y col, 1972), el PL3 (Park y Lin, 1993) y el G-Mat (Gardner y col, 2001).

El fluido oviductal sintético (SOF), medio basado en la composición aniónica y catiónica del fluido oviductal ovino, está siendo empleado cada vez con mayor frecuencia para la maduración de ovocitos bovinos con resultados

bastante aceptables (Gandhi y col, 2000; Ikeda y col, 2000; Watson y col, 2000; Ali y Sirard, 2002; Ali y col, 2005; Iwata y col, 2004; Oyamada y Fukui, 2004).

Ambos medios han sido suplementados con sustancias de naturaleza diversa que revisaremos a continuación.

### II.2.2. MACROMOLÉCULAS

La necesidad de incorporar a los medios de maduración proteínas y otras macromoléculas ha sido objeto de un largo debate. Durante mucho tiempo ha sido una práctica común añadir diversos suplementos proteicos como el suero fetal, el suero de vaca en celo, el suero de toro, la albúmina sérica bovina y la albúmina humana, siendo los más comunes el suero fetal y la albúmina sérica bovina (Fukui y Ono, 1989; Wiemer y col, 1991; Ocaña-Quero y col, 1999; Hasler, 2000). Diferentes experimentos han demostrado que la maduración de los ovocitos bovinos en presencia de suero fetal, permite obtener mayores porcentajes de maduración, segmentación y producción de blastocistos, que en medios suplementados con otras macromoléculas (Leibfried-Rutledge y col, 1986). Además la presencia de estas sustancias disminuye la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (placas de cultivo, pipetas, tubos, etc.).

Se desconoce cual es el papel desempeñado por el suero durante la maduración de los ovocitos bovinos, aunque su efecto beneficiosos se atribuye a su contenido en factores de crecimiento, lípidos, albúmina, hormonas esteroides y proteicas, colesterol, péptidos y otros factores desconocidos. Además, podría proteger al embrión de algunas sustancias tóxicas presentes en el medio cultivo, como por ejemplo, los metales pesados. Todos estos efectos resultan beneficiosos para la maduración del ovocito, sin embargo, la naturaleza indefinida del suero dificulta los trabajos de investigación, supone una fuente de variación entre diferentes lotes (Mckiernan y Bavister, 1992) y representa un riesgo de contaminación (Krisher y col, 1999). Además, se ha comprobado que los CCO bovinos cultivados en microgotas en grupos de 10 ó más, son capaces de madurar en medios libres de suero, sin que ello suponga una reducción de su competencia para el desarrollo (Barnes, 2000).



Algunos estudios han evaluado el efecto de sustituir el suero por otras macromoléculas, comprobando que éstas ejercen un claro efecto sobre el porcentaje de blastocistos y en la eficiencia del sistema (Ali y Sirard, 2002; Mastromonaco y col, 2004). Los efectos observados incluyen modificaciones en el tiempo necesario para que se complete la maduración del ovocito, en la cinética de formación de blastocistos, en el porcentaje de blastocistos obtenidos y en las tasas de eclosión de los mismos (Mastromonaco y col, 2004). Los peores resultados se obtuvieron cuando se utilizaba la fracción V de la BSA, observándose un retraso en la maduración nuclear y menores porcentajes de blastocistos (Ali y Sirard 2002; Mastromonaco y col, 2004). Este hecho indica que algunos componentes presentes en la BSA-V, entre los que podrían estar los ácidos grasos, las proteínas u otros, resultarían perjudiciales para el ovocito (Mastromonaco y col, 2004). La utilización de BSA purificada (Ali y Sirard 2002) o BSA libre de ácidos grasos, permiten lograr buenos porcentajes de maduración y unos porcentajes de blastocistos comparables a los obtenidos utilizando suero (Fukui y col, 2000; Ali y Sirard 2002; Mastromonaco y col, 2004). Otros estudios demuestran que la albúmina recombinante podría ser una buena alternativa para suplementar los medios de maduración, permitiendo mantener la definición del medio (Gardner y col, 2001a).

Así, tratando de estandarizar los procedimientos de PIV y también para tratar de minimizar las posibilidades de transmisión de patógenos, se han empezado a sustituir el suero o la albúmina por otras macromoléculas sintéticas, como el polivinilalcohol (PVA) (Fukui y col, 2000), la polivinilpirrolidona (PVP) (Chung y col, 2007), el Ficoll (Kuleshova y col, 1999) y substitutos del suero, como el Knockout SR (Moore y col, 2007) y el substituto sintético del suero (SSS; Sagirkaya y col, 2007). Las macromoléculas sintéticas más empleadas son el PVA y el PVP en los medios de cultivo para sustituir a la albúmina o el suero, especialmente el PVP-40, que permite obtener unos elevados porcentajes de maduración y de blastocistos (Ali y Sirard 2002), siendo superiores a los logrados con otras sustancias sintéticas como la PVA o el PVP-360. El Ficoll es un polisacárido utilizado frecuentemente en la formulación de las soluciones de vitrificación (Checura y Seidel, 2007) y el Knockout SR es una proteína añadida a los medios usados para el cultivo de las células madre, cuya

fórmula está protegida por el fabricante, pero que no contiene suero (Goldsborough y col, 1998).

Todos estos estudios abren la posibilidad de desarrollar medios de cultivo de composición definida, que faciliten el conocimiento de los efectos de todas y cada una de las sustancias incorporadas al medio. Los trabajos iniciales realizados en la década de los 80 indicaban que el cultivo de los embriones en medios completamente definidos provocaba un bloqueo del desarrollo en sus etapas iniciales (Camous y col, 1984) y una reducción de la viabilidad embrionaria (Wright y Bondioli, 1981), en comparación con los resultados obtenidos al utilizar medios indefinidos o semidefinidos.

### II.2.3. SUSTRATOS ENERGÉTICOS

Para que el ovocito sea capaz de madurar *in vitro* debe disponer de los elementos metabólicos apropiados para la producción de la energía necesaria (Gardner, 1998). Así, durante la maduración citoplásmica se activan algunas de las rutas metabólicas implicadas de la producción de energía y de los precursores necesarios para la biosíntesis (Steeves y Gardner, 1999b). Además, el citoplasma del ovocito deberá acumular las reservas energéticas necesarias para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano, comprobándose que cuando el metabolismo del ovocito resulta alterado por unas condiciones de cultivo inapropiadas durante la maduración, se traduce en un menor porcentaje de blastocistos y una reducción de la viabilidad de los mismos (Krisher y Bavister, 1999).

Los principales sustratos energéticos añadidos a los medios de maduración son la glucosa, el piruvato, el lactato y los aminoácidos. La concentración de cada una de estas sustancias condiciona el comportamiento metabólico del ovocito y por lo tanto su posterior competencia para soportar el desarrollo (Khurana y Niemann, 2000). El ovocito inmaduro utiliza preferentemente piruvato, que juega un papel destacado durante la maduración (Krisher y Bavister, 1999; Geshi y col, 2000; Khurana y Niemann, 2000). La participación de NADP, isocitrato-deshidrogenasa y malato-deshidrogenasa, enzimas claves del ciclo del ácido cítrico, confirman la actividad aeróbica del ovocito (Cetica y col, 2003). La utilización de piruvato por los CCO

se incrementa de forma lineal durante las 24 horas que dura la maduración *in vitro* (Sutton y col, 2003a, b), también se ha comprobado un incremento similar en la utilización de la glutamina durante este mismo periodo. Ambos hechos resaltan la importancia de la vía oxidativa para la producción de energía en los ovocitos bovinos (Rieger y Loskutoff, 1993; Steeves y Gardner, 1999b). Cuando aumenta la demanda de energía la glutamina se utiliza como sustrato energético, pero cuando las necesidades energéticas quedan cubiertas, desempeña un papel de precursor biosintético o de regulador del pH intracelular (Steeves y Gardner, 1999b).

Las necesidades metabólicas del ovocito y las de las células del cúmulo son diferentes (Downs y col, 2002), por lo que el metabolismo energético difiere claramente entre un ovocito cuyo cúmulo está intacto de otro privado del mismo. Los ovocitos desprovistos del cúmulo tienen capacidad muy escasa para utilizar la glucosa y la glutamina (Zuelke y Brackett, 1992; Rieger y Loskutoff, 1993), mientras que los que están rodeados de un cúmulo intacto pueden utilizar la glucosa como única fuente de energía (Biggers y col, 1967) produciendo ATP y piruvato (Biggers y col, 1967; Leese, 1988; Zuelke y Brackett, 1992, 1993; Cetica y col, 1999; Geshi y col, 2000; Cetica y col, 2003; Downs y col, 2006).

La glucosa es el sustrato energético preferido de los CCO durante la maduración (Sutton y col, 2003a) y sus necesidades se incrementan gradualmente a lo largo del periodo de maduración *in vitro*. La constante producción de L-lactato a lo largo de las 24 h de maduración, indica que la utilización de glucosa para la producción de ATP a través de la glucólisis se mantiene inalterada (Sutton y col, 2003a, b). La presencia de una considerable actividad de la fosfofructoquinasa, enzima reguladora de la glucólisis, en las células del cúmulo, reafirma la actuación de este tipo celular como proveedor de sustratos para el ovocito a través de la glucólisis (Cetica y col, 2002).

La glucosa puede ser metabolizada, también, a través del ciclo de las pentosas fosfato por el CCO y ello parece estar directamente relacionado con la progresión en la meiosis. La capacidad de la FSH para inducir la reactivación de la meiosis podría estar relacionada con su efecto estimulador de esta ruta

metabólica. Así, el aumento de actividad de la ruta de las pentosas fosfato en las células del cúmulo, induce la disolución de la vesícula germinal en el ovocito. Esta vía determina la formación de los nucleótidos y de sustancias reductoras (NADPH), que intervienen en la biosíntesis de lípidos y esteroides (Downs *y col*, 1998; Downs y Utchet, 1999). El NADPH generado por la ruta de las pentosas fosfato en el ovocito o en las células del cúmulo, puede ser necesario para la síntesis de lípidos y la generación de glutatión reducido (Cetica *y col*, 2002).

La importancia relativa de la vía glucolítica disminuye gradualmente a medida que progresa la maduración, y al final de la misma adquiere mayor protagonismo la ruta de las pentosas fosfato para la producción de los sustratos involucrados en la maduración nuclear. Sin embargo, la actividad glucolítica que existe al final del período de maduración puede estar relacionada con la síntesis de los componentes de la matriz extracelular que participan en la expansión del cúmulo (Sutton *y col*, 2003a, b, 2004). El principal componente de la matriz extracelular es el ácido hialurónico, que puede ser sintetizado a partir de la glucosa, o de su precursor directo la glucosamina, en caso de estar presente en el medio. La incorporación de glucosamina al medio de maduración, ofrece un sustrato directo para la síntesis de la matriz y evita la excesiva depleción de glucosa del medio (Sutton *y col*, 2004).

La presencia de glucosa en el medio de maduración es necesaria para que la maduración nuclear se complete (Hashimoto *y col*, 2000b) y para que el ovocito adquiriera la competencia para soportar el desarrollo (Khurana y Niemann, 2000b; Iwata *y col*, 2004). Los ovocitos desnudos incrementan significativamente su utilización a medida que maduran (Steeves y Gardner, 1999b) y los que presentan una actividad glucolítica más reducida dan lugar a embriones con escasas posibilidades de desarrollo (Krisher y Bavister, 1999). Los ovocitos metabolizan la glucosa, principalmente, a través de la ruta de las pentosas fosfato (Krisher y Bavister, 1998), como se pone de manifiesto por la existencia de una gran actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Cetica *y col*, 2002).

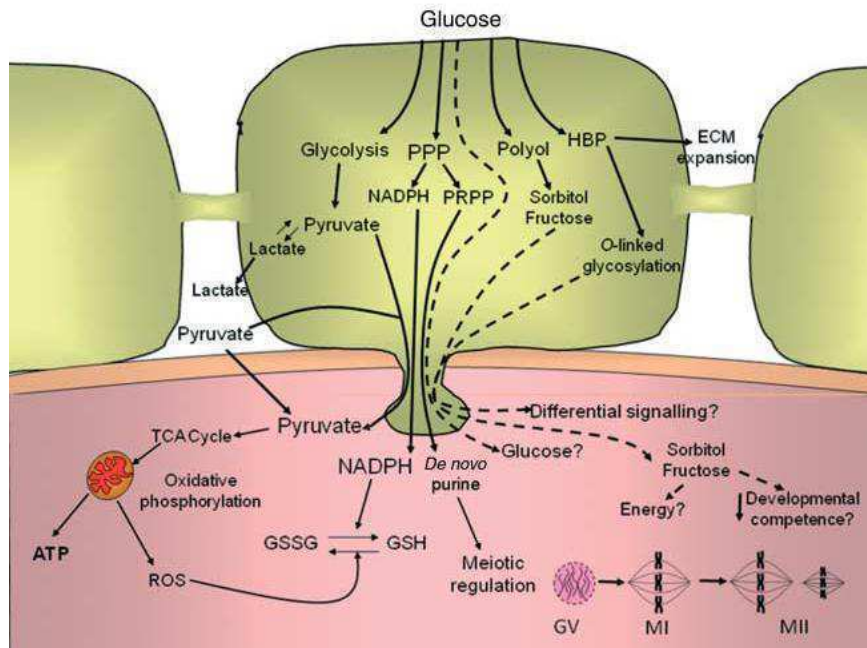


Figura 5. Modelo propuesto para las interacciones y actividades de las células del cúmulo y el ovocito (Tomado de Sutton y col, 2010)

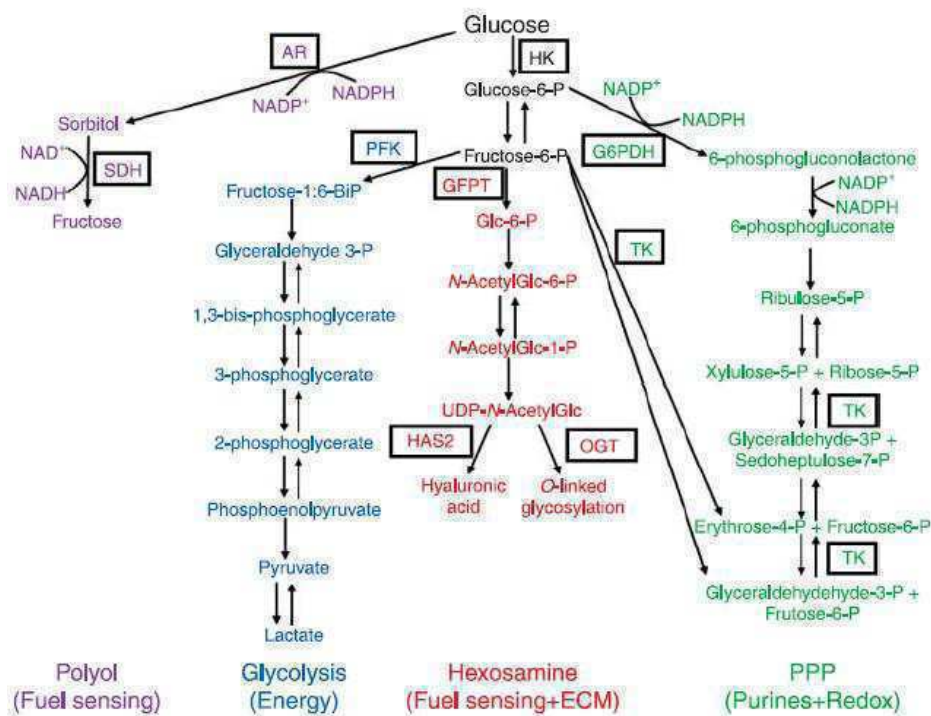


Figura 6. Rutas metabólicas a través de las cuales la glucosa puede ser utilizada en el CCO (Tomado de Sutton y col, 2010)

#### II.2.4. AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos pueden ser utilizados por las células del cúmulo para producir energía o ser transportados al ovocito a través de las uniones gap (Colonna y Mangia, 1983). Su incorporación a los medios de maduración permitió incrementar significativamente el porcentaje de blastocistos y los niveles de ARN de origen maternal (Watson y col, 2000). Cuando se utiliza un medio libre de proteínas, la presencia de glucosa y aminoácidos mejora significativamente las tasas de desarrollo embrionario, hecho que no se consigue combinando piruvato con glucosa o glutamina, lo que pone de manifiesto el destacado papel jugado por los aminoácidos (Krisher y Bavister, 1998).

Algunos aminoácidos desempeñan funciones específicas. Así, la cisteína, intervienen en la producción de GSH, agente reductor que protege a las células frente a las sustancias oxígeno reactivas. Por ello es de suma importancia disponer de una adecuada concentración de cisteína en el medio de maduración, ya que la GSH acumulada durante este periodo es necesaria para la descondensación del núcleo del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino. La adición de cisteamina y  $\beta$ -mercaptoetanol al medio de maduración en presencia de cisteína o cistina aumenta la competencia de los ovocitos (de Matos y col, 1995, 1996).

El aspartato puede ser utilizado por el ovocito como sustrato energético, pero, además, interviene en la regulación del estado de oxidación-reducción, al ser convertido en oxalacetato y malato. El ovocito bovino, al igual que todos los tejidos con elevada capacidad de metabolizar el lactato, presenta una elevada actividad enzimática del sistema aspartato-malato, que puede ser capaz de regenerar en el citoplasma los equivalentes reducidos (NAD), requeridos para la utilización del lactato. La alanina, el aspartato y el isocitrato pueden ser utilizados por el CCO como sustratos oxidativos. Adicionalmente la conversión de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato puede participar en la generación de NADPH, colaborando en la ruta de las pentosas fosfato (Cetica y col, 2003).

A las temperaturas utilizadas durante el cultivo *in vitro* (37-39° C), los aminoácidos se degradan de manera espontánea produciendo amonio

(Gardner y Lane, 1993; Ikeda y col, 2000; Lane y Gardner, 2003). Algunos estudios señalan que la exposición de los ovocitos al ión amonio, cuando se encuentran en el interior del folículo, puede comprometer su competencia para soportar el desarrollo, tal y como se ha comprobado en hembras alimentadas con fuentes nitrogenadas fácilmente degradables (Sinclair y col, 2000). Sin embargo, otros estudios indican que la concentración de amonio en el fluido de folículos pequeños (<1 mm) es generalmente elevada y disminuye a medida que aumenta el tamaño folículo (Hammon y col, 2000b). La utilización durante la maduración *in vitro* de concentraciones de amonio iguales o superiores a las encontradas en los folículos antrales tempranos, no produce efectos adversos en los porcentajes de segmentación o de blastocistos. Estos datos indican que los ovocitos bovinos son capaces de tolerar concentraciones de amonio bastante elevadas durante la maduración *in vitro* (Hammon y col, 2000b).

#### II.2.5. HORMONAS

Existe cierta controversia en relación a los efectos de las gonadotrofinas y a su importancia durante la MIV (Gordon, 1994). Sin embargo, la mayor parte de los protocolos utilizados por distintos investigadores para la MIV suelen incorporar FSH y LH en el medio de maduración para estimular la meiosis. No obstante, los resultados obtenidos en los experimentos en los que se evalúan sus efectos durante la maduración *in vitro* son contradictorios (Zuelke y Brackett, 1990; Dominko y First, 1997; Choi y col, 2001) y muy difíciles de comparar, debido a la naturaleza indefinida de los productos hormonales utilizados. Así, las hormonas utilizadas son de orígenes diversos, se obtienen empleando métodos de purificación diferentes y tienen grados de contaminación cruzada variables, todo ello impide obtener conclusiones claras (Choi y col, 2001). Algunos estudios en los que se utilizan medios semidefinidos indican que la suplementación con LH y FSH no ejerce ningún efecto favorable sobre la competencia de los ovocitos, ni sobre el número total de células que forman los blastocistos (Choi y col, 2001). Sin embargo, otros autores señalan que la presencia de FSH produce un efecto beneficioso, mientras que la LH no provoca efecto alguno (Van Tol y col, 1996).

Algunos estudios demuestran que las células del cúmulo expresan receptores para la LH (Nuttinck y col, 2004) y que su número aumenta entre las 6 y las 24 horas de maduración *in vitro* (Calder y col, 2003). Sin embargo, la presencia de la LH en el medio de maduración no incrementa la proporción de ovocitos que alcanzaron la metafase II, aunque en la especie bovina aceleraba la velocidad de reanudación y progresión de la meiosis (Dominko y First, 1997) y el porcentaje de blastocistos obtenidos (Zuelke y Brackett, 1990; Dominko y First, 1997). Esta hormona, parece actuar a través de las células del cúmulo favoreciendo la oxidación de la glucosa (Zuelke y Brackett, 1992) y de la glutamina (Zuelke y Brackett, 1993).

La FSH estimula la producción de AMPc en las células del cúmulo y retarda la maduración meiótica espontánea (Izadyar y col, 1998; Thomas y col, 2004). La elevación de AMPc en las células del cúmulo, mediada por la activación de la proteína quinasa A (PKA), ha sido propuesta como el mensajero secundario responsable de la reanudación de la meiosis (Izadyar y col, 1998). Además, la FSH puede estimular la actividad secretora de las células del cúmulo para producir el esteroide activador de la meiosis (MAS), sustancia que estimularía la reanudación de la meiosis por vía paracrina (Byskov y col, 1997). La producción de este factor activador de la meiosis puede estar relacionada con la activación de la PKC en las células del cúmulo.

Actualmente, existe la posibilidad de utilizar hormonas de origen recombinante. Estas sustancias son de mayor pureza y no están contaminadas con otras sustancias, como sucede con las obtenidas a partir de extractos hipofisarios, suero u orina utilizando técnicas de purificación. Los experimentos realizados por Anderiesz y col (2000) indicaban que la suplementación del medio de maduración con r-hFSH o con r-hLH no provocaba ningún efecto beneficioso. Sin embargo, cuando se combinaban ambas en una proporción 1:10 aumentaba la maduración meiótica y la competencia de los ovocitos para soportar desarrollo. Por el contrario Izadyar y col (1998), observó que la inclusión de r-hFSH en el medio de maduración incrementaba los porcentajes de segmentación y de blastocistos, atribuyendo este último efecto a que mejoraba la maduración citoplasmática, dado que los porcentajes de ovocitos en metafase II no variaron.



La presencia de receptores para la FSH queda restringida a las células del cúmulo (Nuttinck y col, 2004) y su número disminuye 6 horas después de iniciarse la maduración *in vitro*, cuando se utiliza un medio suplementado con suero, gonadotrofinas y  $17\beta$ -estradiol (Calder y col, 2003). Un estudio posterior demostró que restringiendo el estímulo FSH a las primeras 6 horas de maduración permitía incrementar significativamente la competencia para el desarrollo de los CCO bovinos (Ali y Sirard, 2005).

El  $17\beta$ -estradiol suele incorporarse a los medios de maduración a una concentración de  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ , al ser ésta la existente en los folículos preovulatorios bovinos (Dieleman y col, 1983). Sin embargo, no existe un acuerdo unánime de que su efecto sea beneficioso. Algunos autores indican que favorece la maduración (Fukui y col, 1982; Younis y col, 1989), otros señalan que sus efectos están condicionados por la concentración (Ali y Sirard, 2002), mientras que otros autores observan un efecto negativo (Beker y col, 2002). Estas divergencias en los resultados podrían ser consecuencia de que unos medios de maduración contienen suero y otros BSA. Estos compuestos contienen gonadotropinas, factores de crecimiento, esteroides y péptidos en concentraciones variables (Keskintepe y Brackett, 1996; Wang y col, 1997), que podrían generar variaciones en los efectos del estradiol. Así, los trabajos de Beker y col (2002) demostraron que los efectos negativos del estradiol sobre la maduración nuclear desaparecían cuando el medio contiene FSH, lo que podría explicar la ausencia de efectos adversos en los medios de maduración que contienen suero y gonadotrofinas. Además, la presencia de estradiol en el medio de maduración no parece afectar a la maduración citoplasmática, puesto que no repercute negativamente en la proporción de blastocistos obtenidos (Beker-van Woudenberg y col, 2004), ni en la calidad de los mismos (Beker y col, 2002).

Las células del cúmulo expresan los dos receptores para los estrógenos conocidos como  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que los ovocitos solamente expresan el receptor  $\beta$  (por revisión ver: Hall y col, 2001).

## II.2.6. FACTORES DE CRECIMIENTO

Algunas evidencias experimentales indican que ciertos factores de crecimiento participan de forma activa en el proceso de selección del folículo dominante (Fortune y col, 2004) y en la regulación de algunos procesos intrafoliculares. Dentro de los factores de crecimiento los que parecen desempeñar un papel más relevante son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), (para revisión ver: Fortune y col, 2004; Van den Hurk y Zhao, 2005).

Downs (1989) señaló que el EGF es el factor de crecimiento más efectivo para inducir la maduración *in vitro* y promover la expansión del cúmulo. Posteriormente se ha comprobado que las células del cúmulo expresan receptores para el EGF (Gall y col, 2004), por lo que su efecto estaría mediado a través de estas células (Lorenzo y col, 1994). La unión del EGF a su receptor determina el inicio de una cascada de señales que provocan la activación de la tirosina quinasa, que a su vez induce la depleción del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo endoplásmico (Hill y col, 1999), la elevación de su concentración intracelular, y el subsiguiente aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y la muerte celular. El EGF produce la pérdida de la viabilidad de las células del cúmulo por el incremento de la permeabilidad de su membrana plasmática, de manera que la muerte de las células del cúmulo reduce la barrera física existente entre el espermatozoide y el ovocito (O'Donnell y col, 2004; Zhao y col, 2005).

Cuando se añade EGF a los medios utilizados para la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos se observa un efecto positivo sobre su maduración (Lonergan y col, 1996; Sakaguchi y col, 2000; 2002) y en su competencia para soportar el desarrollo (Harper y Brackett, 1993; Lonergan y col, 1996; Watson y col, 2000). Harper y Brackett (1993) indican que la interacción las gonadotrofinas y EGF podrían jugar un papel destacado en la regulación de la maduración de los CCO y serían uno de los componentes del suero capaces de favorecer su maduración. Posteriormente Watson y col (2000), comprobaron que la presencia de EGF en un medio de maduración definido (SOFaa) y libre

de hormonas también ejerce un efecto positivo sobre la proporción de los blastocistos obtenidos.

El IGF-1 se comporta en el ovario como un amplificador natural de las acciones ejercidas por la FSH (Hsu y Hammond, 1987) y algunos autores señalaron que la incorporación de IGF-1 junto a gonadotrofinas al medio utilizado durante la maduración de los ovocitos bovinos *in vitro*, favoreció el proceso de maduración y el desarrollo embrionario posterior (Herrler y col, 1992). Sin embargo, estos efectos únicamente fueron evidentes cuando la maduración tenía lugar en ausencia de suero (Sakaguchi y col, 2000).

#### II.2.7. ATMÓSFERA GASEOSA

La mayoría de los estudios realizados indicaban que la utilización de una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire durante la maduración *in vitro* permite obtener mejores resultados, por lo que se ha señalado que la maduración nuclear depende de la disponibilidad de oxígeno (por revisión ver: Cetica y col, 2003) y que la reducción de la concentración de O<sub>2</sub> comprometía la posterior competencia para soportar el desarrollo (Watson y col, 2000). Sin embargo, algunos trabajos demuestran que los ovocitos madurados en presencia de elevadas concentraciones O<sub>2</sub> sufren las consecuencias de la presencia de altos niveles de sustancias oxígeno reactivas (ROS) (Hashimoto y col, 2000a). Por ello, se ha investigado la posibilidad de madurar los ovocitos bovinos utilizando atmósferas con un bajo contenido en O<sub>2</sub>, situación que parece posible cuando se incrementa la concentración de glucosa en el medio de maduración (Hashimoto y col, 2000a; Oyamada y Fukui, 2004).

Una de las principales vías de generación de ROS es el catabolismo de la hipoxantina; el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la enzima hipoxantina-fosforribosiltransferasa (HPRT) (Downs y Dow, 1991), responsable del salvamento de los nucleótidos, produciría el aumento del catabolismo de la hipoxantina y consecuentemente de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provocando daño celular. Adicionalmente, la glucosa puede sufrir autooxidación y generar radicales libres (Hunt y col, 1988).

Las condiciones de cultivo *in vitro* son propicias para la generación de ROS, debido a la elevada tensión de oxígeno y a la escasez de sistemas antioxidantes. La actividad de ciertos antioxidantes, puede variar en función de la concentración de glucosa y atmósfera gaseosa utilizada. La elevada concentración de glucosa puede favorecer la generación de radicales libres (Iwata *y col*, 1998; Oyamada y Fukui, 2004) y un descenso en los niveles intracelulares de glutatión en el ovocito (Hashimoto *y col*, 2000b). Esto implica que las concentraciones óptimas de los substratos energéticos en el medio de maduración, pueden variar en función de la atmósfera gaseosa utilizada (Hashimoto *y col*, 2000a, b; Oyamada y Fukui, 2004). Así, la asociación de altas concentraciones de glucosa con altas tensiones de O<sub>2</sub>, promueven la producción de ROS en el ovocito y compromete su competencia para el desarrollo (Hashimoto *y col*, 2000a, b). Por el contrario, el incremento de la concentración de glucosa en presencia de una baja tensión de O<sub>2</sub>, reduce la generación de ROS y por lo tanto promueve el desarrollo a blastocistos (Hashimoto *y col*, 2000a; Oyamada y Fukui, 2004) e incrementa su criotolerancia a la vitrificación (Oyamada y Fukui, 2004).

### III. PREPARACIÓN ESPERMÁTICA Y FECUNDACIÓN *IN*

#### *VITRO*

Para lograr la fecundación *in vitro* es necesario una preparación previa de los espermatozoides y de los ovocitos, y posteriormente cultivar conjuntamente ambos gametos en unas condiciones apropiadas para que se mantenga su actividad metabólica.

#### III.1. PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS.

En la mayor parte de los laboratorios en los que se producen embriones bovinos *in vitro*, se utilizan para la fecundación espermatozoides congelados-descongelados, debido a que resulta más fácil disponer de éstos que de los procedentes de eyaculados frescos. Además, los espermatozoides recién eyaculados requieren un proceso de capacitación más prolongado (Lengwinat *y col*, 1990). Los espermatozoides congelados se capacitan con mayor facilidad

aunque también se deterioran con mayor rapidez, provocando una reducción de las tasas de penetración (Gordon, 1994).

Cuando se utiliza semen congelado es necesario eliminar algunos componentes presentes en el diluyente, ya que pueden afectar negativamente a la capacitación espermática (Parrish y First, 1987). Para ello es necesario una preparación previa, que implica la eliminación del diluyente (Parrish, 1991) y la selección de los espermatozoides móviles y morfológicamente normales. Las técnicas más empleadas para la selección de los espermatozoides, en la actualidad, son el “swim-up” (Parrish y col, 1986) y la centrifugación a través de un gradiente discontinuo de Percoll (Saeki y col, 1991).

La centrifugación en gradiente de Percoll se realiza con mayor rapidez y permite recuperar un mayor número de espermatozoides (Avery y Greve, 1995). Los espermatozoides son separados en función de su densidad (Bolton y Braude, 1984). Así, los espermatozoides cuya morfología nuclear es normal son los más densos, por lo que se depositan en la fracción más rica en Percoll (Iritani, 1991), mientras que los espermatozoides muertos o degenerados, el plasma seminal y el diluyente permanecen en la fracción menos densa (Avery y Greve, 1995). Seidel y col (1995) no encontrando diferencias significativas con respecto a los porcentajes de cigotos divididos cuando compararon los resultados obtenidos utilizando espermatozoides separados mediante ambos procedimientos.

### III.2. CAPACITACIÓN IN VITRO.

Antes de que los espermatozoides sean capaces de fecundar a los ovocitos deben experimentar un proceso de preparación conocido con el nombre de capacitación. Cuando se determinó la composición de las secreciones oviductales, se comprobó un elevado contenido en glucosaminoglicanos (Lee y col, 1984), cuyo papel es determinante en la capacitación espermática y en la reacción acrosómica (Parrish y col, 1989). Además, Handrow y col (1982), observaron que la heparina se fijaba directamente a las proteínas de superficie de los espermatozoides facilitando la reacción acrosómica (Ax y col, 1987). A partir de este momento comenzó a emplearse la heparina para inducir la capacitación espermática de los espermatozoides bovinos *in vitro*. Inicialmente

se realizaba una preincubación de los espermatozoides en un medio capacitante, antes de incorporarlos al medio de cultivo en el que se encontraban los ovocitos. Posteriormente, algunos autores (Shi, 1991; Lonergan, 1992 y Fair, 1992) observaron que la incorporación directa de la heparina al medio de fecundación permitía incrementar el porcentaje de ovocitos fecundados y el de blastocistos obtenidos.

Los espermatozoides procedentes de los distintos toros presentan diferencias en su respuesta a la heparina (Ellington y col 1991), siendo uno de los factores determinantes de las grandes variaciones en el número de blastocistos producidos *in vitro* (Lambert y col, 1984). Existen grandes diferencias en la respuesta a la heparina en función de que los espermatozoides procedan de un eyaculado del epidídimo (Miller y col, 1981). Este hecho parece ser consecuencia de que las vesículas seminales producen proteínas específicas implicadas en la fijación de la heparina (Nass y col, 1990).

Debemos tener en cuenta que el efecto de la heparina depende de su concentración y de la duración del periodo de incubación (Fukui y col, 1990). Así, cuando se incrementa la concentración de heparina o la duración del periodo de incubación aumenta el porcentaje de polispermia (Lu y Gordon 1988).

### III.3. PRESENCIA DE CÉLULAS DEL CÚMULO.

En la especie bovina las células del cúmulo son eliminadas durante la ovulación o inmediatamente después de la misma, facilitando la interacción de los espermatozoides con la zona pelúcida. Este hecho ha determinado que, en algunos trabajos, se haya tratado de reproducir este proceso fisiológico eliminando total o parcialmente las células del cúmulo, para facilitar el acceso de los espermatozoides a los ovocitos. Sin embargo, se ha comprobado que las células del cúmulo favorecen la fecundación, participando en la inducción de la reacción acrosómica (Fukui, 1990) y contribuyendo a mantener la motilidad de los espermatozoides (Ijaz y col, 1994). Además, se ha comprobado que la penetración espermática es similar en los ovocitos desnudos y en los que mantienen un cúmulo intacto, mientras que los porcentajes de polispermia son superiores en los primeros (Behalova y Greve, 1993).

### III.4. MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADAS DURANTE LA FECUNDACIÓN.

El medio de cultivo empleado para mantener a los ovocitos y los espermatozoides durante el tiempo necesario para que se produzca la fecundación, deberá ser capaz de mantener la viabilidad del ovocito secundario y de inducir la capacitación espermática. Los medios más comúnmente usados durante esta etapa son: el TALP (Parrish y col, 1988) y el BO (Brackett and Oliphant medium, Brackett y Oliphant, 1975). En muchos laboratorios se incorpora al medio BSA, debido a que esta macromolécula favorece la inducción de la reacción acrosómica de los espermatozoides bovinos (Byrd, 1981) y a que actúa como aceptor del colesterol. Otros investigadores han sustituido la BSA por suero fetal bovino (Leibfried-Rutledge y col, 1986; Younis y col, 1989) o suero de vaca (Younis y col, 1989; Sanbuissho y Threlfall, 1989).

Las condiciones de cultivo de los espermatozoides y los ovocitos son: 16-22 horas a 39°C en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub> en aire (Fukui y col, 1990). Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se comprueba que la utilización de una baja tensión de oxígeno durante la fecundación *in vitro* de ovocitos ovinos, mejora la calidad de los blastocistos obtenidos (Leoni et al, 2007).

### III.5. CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS Y DURACIÓN DEL CULTIVO

La duración del periodo de cultivo de los ovocitos y los espermatozoides es otro de los factores a considerar en los protocolos utilizados para la producción de embriones *in vitro*. Durante mucho tiempo se ha utilizado un periodo de coincubación comprendido entre 18 y 24 horas, tal y como fue recomendado por First y Parrish (1987). Sin embargo, algunos estudios posteriores han demostrado que cuando la coincubación dura 12 horas los resultados son similares (Dode y col 2002) e incluso otros autores indicaron que una coincubación de 6 h permitía obtener un mayor porcentaje de blastocistos (Kochhar y col 2003).

Cuando la fecundación se produce *in vivo*, la relación espermatozoides/ovocito es aproximadamente de 1:1 (Hunter, 1993). Sin embargo, cuando la fecundación tiene lugar *in vitro* se suele utilizar una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml, lo que determina que la proporción espermatozoides/ovocito sea 10.000:1 (Gordon, 1994).

Algunos autores indican que existen variaciones individuales en cuanto a la concentración de espermatozoides necesaria para la FIV, de tal manera que cuando se ajusta dicha concentración se puede lograr reducir las diferencias existentes entre toros en cuanto al porcentaje de blastocistos obtenido (Camargo y col 2002a; Lu y Seidel, 2004).

### III.6. SUSTANCIAS ESTIMULANTES DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA.

Los medios de fecundación han sido suplementados con diversas sustancias químicas con la finalidad de estimular la motilidad de los espermatozoides bovinos y mantenerla durante un periodo suficientemente prolongado como para lograr la fecundación. Una de ellas es la cafeína, nucleótido cíclico que estimula la motilidad al inhibir las fosfodiesterasas e incrementar el contenido intracelular de AMPc. Este último regula el intercambio de calcio y fosfato inorgánico a través de la membrana plasmática. Pomeroy y col (1988), observaron que el tratamiento de los espermatozoides de ratón con cafeína, ocasionaba un incremento de su capacidad fecundante, debido a que favorecía la reacción acrosómica y la fijación de los espermatozoides a la zona pelúcida. Existen diversos estudios que demuestran que la cafeína aumenta la motilidad y la actividad respiratoria de los espermatozoides de toro (Garbers y col, 1971; Ball y First, 1983; El-Gaafary y col, 1990).

Posteriormente, se comprobó que la incorporación a los medios de fecundación de una mezcla compuesta por D-penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE), incrementaba significativamente la motilidad espermática y el porcentaje de ovocitos penetrados (Leibfried y Bavister, 1982; First y Parrish, 1987a; Greve y col, 1987; Boatman y col, 1988; Miller y col, 1992, 1994). Además, esta mezcla disminuía el intervalo de tiempo transcurrido entre la inseminación y la penetración de los ovocitos (Susko-Parrish y col, 1990), debido



a que estas sustancias ejercían un efecto sinérgico. La mezcla PHE podría actuar, además, como un antioxidante, protegiendo a los ovocitos y a los espermatozoides de los efectos negativos de la elevada tensión de O<sub>2</sub> presente en el medio de cultivo o limitando los efectos negativos producidos por los radicales libres (Miller et al, 1994), ya que se ha comprobado que la hipotaurina y la epinefrina, reducen la formación de superóxidos (Alvarez y Storey, 1983).

### III.7. ANORMALIDADES PRODUCIDAS DURANTE EL PROCESO DE FECUNDACIÓN.

Durante este proceso pueden producirse diversas anomalías que repercuten negativamente en el desarrollo embrionario. Las más frecuentes son: la polispermia, la poliginia (aparición de más de dos pronúcleos), la pre-activación del ovocito y la asincronía en el desarrollo (Xu y Greve, 1987, 1988).

La fecundación polispérmica es uno de los principales problemas observados en la mayor parte de las especies de mamíferos cuando se utiliza la fecundación *in vitro*. Esta situación es ocasionada por la baja calidad de los ovocitos maduros (Gruppen et al, 1997; Pavlok et al, 1997; Wang et al, 1997), la existencia de un número de espermatozoides capacitados excesivamente elevado (Hunter, 1991; Kim et al, 1997) o la elevada concentración de sustancias inductoras de la reacción acrosómica en el medio de fecundación (Singh et al, 1997; Tajik et al, 1993). En condiciones naturales los ovocitos de los mamíferos se protegen frente a la polispermia generando una barrera, que actúa a nivel de la zona pelúcida, de la membrana vitelina o de ambas. Sin embargo, durante la fecundación *in vitro*, el número de espermatozoides que alcanzan las proximidades del ooplasma es muy elevado, debido a la gran eficiencia del método de capacitación espermática (Chian y col, 1992). Estos mismos investigadores observaron que cuanto mayor era la duración del periodo de coincubación de los espermatozoides y los ovocitos, mayor era el porcentaje de polispermia. La concentración de heparina también condiciona la tasa de polispermia, por lo que se recomienda no superar 10 UI/ml (Pavlok, 2000). Sin embargo, los porcentajes de polispermia observados en la especie bovina son sensiblemente inferiores a los de otras especies como el cerdo, lo

que sugiere que en esta especie el mecanismo de bloqueo de la polispermia es muy eficaz.

El porcentaje de aberraciones cromosómicas de los embriones producidos *in vitro* es el doble del observado en los obtenidos *in vivo* (Iwasaki et al 1992). Estas alteraciones se originan preferentemente durante la meiosis o la primera mitosis (Lonergan y col 1999), y han sido cifradas en torno a un 34% (Slimane y col 2000).

Otra anomalía descrita es la asincronía en la formación de los pronúcleos, comprobándose que la descondensación de la cabeza del espermatozoide puede detenerse en cualquier etapa del proceso. Este hecho parece ser consecuencia de que el componente citoplásmico responsable de la formación del pronúcleo masculino, solamente está presente en el 50% de los ovocitos madurados *in vitro* (Fulka et al, 1982) o de su baja concentración (Calvin et al, 1986).

#### IV. CULTIVO *In Vitro*

El cultivo *in vitro* de los embriones ha sido objeto de estudio por numerosos investigadores durante los últimos 30 años. Sin embargo, todavía quedan muchos aspectos por resolver en relación a los efectos de las condiciones de cultivo sobre el desarrollo embrionario y en las características anatómicas y fisiológicas de los fetos y neonatos generados a partir de embriones producidos *in vitro*. A pesar de que los embriones de los mamíferos tienen una gran plasticidad, lo que les permite sobrevivir en condiciones muy diferentes, los embriones producidos *in vitro* son de baja calidad y tienen menor viabilidad (Lane, 2001).

Existen diferentes sistemas de cultivo embrionario que pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo a su formulación: indefinidos, cuando se utiliza suero y/o cultivo con células somáticas; semidefinidos cuando se omite el cultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando el

suero se reemplaza por macromoléculas sintéticas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona.

Uno de los componentes principales de los medios indefinidos es el suero, debido a que aporta numerosas sustancias que favorecen el desarrollo embrionario: aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y sustratos energéticos. No obstante, también contamina el medio con factores embriotóxicos (Bavister, 1995). El suero ejerce un efecto bifásico que es negativo durante las primeras etapas del desarrollo, al inhibir las primeras divisiones celulares, pero es positivo en etapas posteriores, estimulando el desarrollo embrionario temprano (Bavister, 1995). Así, la adición de suero mejora la cinética del desarrollo embrionario (Lequarre y col, 2003; Rizos y col, 2003), el porcentaje de cigotos que se desarrollan hasta blastocisto y el número de células que constituyen éstos (Holm y col, 2002; Lazzari y col, 2002). Sin embargo, la presencia de suero durante el cultivo aumenta el acumulo de lípidos, reduce la resistencia a la criopreservación (Abe y col, 2002), incrementa el porcentaje de machos (Gutiérrez-Adan y col, 2001), y altera la expresión génica (Wrenzycki y col, 2001; Rizos y col, 2003). Además se ha relacionado con la aparición de numerosas alteraciones fenotípicas observadas durante la gestación y la vida postnatal, como alteraciones placentarias y síndrome de exceso de volumen fetal (Young y col, 1998; McEvoy, 2003).

En los sistemas de cultivo indefinidos se utiliza también el cultivo con células somáticas. Este procedimiento es muy habitual en Brasil, donde se producen más de 300.000 embriones al año. Las células somáticas favorecen el desarrollo embrionario eliminando algunas sustancias embriotóxicas presentes en el medio de cultivo (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Bavister y col, 1992; Kane y col, 1992; Mermillod y col, 1992), produciendo sustancias que favorecen multiplicación o la diferenciación celular (Bavister y col, 1992; Kane y col, 1992) o modificando las concentraciones de algunos sustratos energéticos (Moore y Bondioli, 1993; Rieger y col, 1995; Edwards y col, 1997). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, su utilización provoca algunos inconvenientes. En primer lugar constituyen una fuente de variación al utilizarse tipos celulares muy diferentes procedentes de distintas especies. Además, estas células constituyen un riesgo de incorporar patógenos al cultivo, ya que se ha demostrado que son

susceptibles a la contaminación por virus como los de la diarrea vírica bovina (Waldrop y col, 2004) y el herpesvirus bovino tipo 1 (Vanroose y col, 1999).

Estos hechos llevaron al desarrollo de sistemas de cultivo semidefinidos en los que se reemplazó el suero por albúmina sérica y en los que no se utilizaba el cultivo con células somáticas. La albúmina es una proteína abundante en el tracto genital de los mamíferos, que podría desempeñar un papel nutritivo durante el desarrollo embrionario temprano (Thompson, 2000). Algunos estudios permitieron demostrar que los embriones bovinos pueden ser cultivados en medios con concentraciones muy bajas de BSA (Krisher y col, 1999) y que los embriones producidos en estas condiciones soportaban mejor la criopreservación (Rizos y col, 2003). Sin embargo, la BSA es de origen biológico, por lo que puede ser objeto de contaminación y no se conocen sus efectos sobre el desarrollo. Miles y col (2005) han descrito algunas alteraciones en el desarrollo inicial de la placenta cuando los embriones bovinos habían sido producidos en medios semidefinidos. Una alternativa disponible es la utilización de BSA de origen recombinante (Lane y col, 2003).

Algunos investigadores demostraron que los embriones bovinos podían desarrollarse en medios libres de proteína (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Keskinetepe y col, 1995; Holm y col, 1999), lo que permitió desarrollar medios de cultivo definidos. Estos medios tienen la ventaja de evitar los efectos nocivos del suero, la albúmina y los cultivos, y al mismo tiempo permiten realizar estudios para conocer las necesidades de los embriones durante su desarrollo temprano. No obstante, en este sistema de cultivo se obtienen menos blastocistos que en los sistemas indefinidos o semidefinidos (Lonergan y col, 1999; Kuran y col, 2001; Orsi y Leese, 2004), lo que ha limitado su utilización a escala comercial.

Se han diseñado multitud de medios simples para mejorar el cultivo de los embriones bovinos y controlar mejor las condiciones de cultivo: SOF (Tervit y col, 1972; Krisher y col, 1999), CR1aa y CR2 (Rosenkrans y First, 1991), CZB (Ellington y col, 1990), KSOM (Erbach y col, 1994), G1.2 y G2.2 (Gardner, 1994), BECM (Dobrynsky y col, 1996; Lim y col, 1999), G1 (Krisher y col, 1999), y IVD101 (Abe y Hoshi, 2003).

Estos medios han sido suplementados con diversos componentes al objeto de satisfacer las necesidades de los embriones: aminoácidos, debido a su efecto beneficioso durante el desarrollo embrionario temprano (Pinyopummintr y Bavister, 1996; Lee y col, 2004), factores de crecimiento para mejorar el porcentaje de blastocistos (Byrne y col, 2002; Sirisathien y col, 2003) y la tasa de implantación (Block y Hansen, 2007), glutatión, superóxido dismutasa o taurina, cisteamina y  $\beta$ -mercaptoetanol como antioxidantes; quelantes como el EDTA (Olson y Seidel, 2000b), o desferrioxamina (Harvey y col, 2007), vitaminas (Olson y Seidel, 2000a), y otras moléculas como la coenzima Q10, (Stojkovic y col, 1999), citrato sódico y mioinositol (Holm y col, 1999), hialuronato (Stojkovic y col, 2002; Palasz y col, 2006), e insulina–transferrina–selenito (ITS; Palasz y col, 2000).

La glucosa es el principal sustrato energético de las células, no obstante produce algunos efectos nocivos durante el desarrollo embrionario temprano (Bavister, 1995). Durante las primeras etapas los embriones prefieren como sustratos energéticos el lactato y el piruvato (Pinyopummintr y Bavister, 1996) existiendo una elevada oxidación de lactato hasta la etapa de 8 células (Khurana y Niemann, 2000). La utilización de glucosa se incrementa a partir de la compactación, siendo metabolizada a lactato (Sinclair y col, 2003). En las etapas iniciales del desarrollo embrionario, la glucosa inhibe la fosforilación oxidativa a través de los metabolitos procedentes de la glucólisis (Bavister, 1995). Además, cuando la concentración de glucosa es elevada se incrementa la proporción de machos (Bredbacka y Bredbacka, 1996) al retardar el desarrollo de los embriones hembra. Este efecto podría ser causado por la expresión diferencial de algunos genes ligados al cromosoma X (Bredbacka y Bredbacka, 1996; Kimura y col, 2005). Sin embargo, la supresión de la glucosa del medio de cultivo no parece ser la mejor solución, ya que es un sustrato imprescindible para la síntesis de ribosa y la producción de NADPH (Bavister, 1995; Thompson, 2000), por ello se utilizan medios con baja concentración de glucosa.

Las secreciones oviductales contienen diversos aminoácidos que pueden ser utilizados por los embriones (Bavister, 1995) y su presencia en los medios de cultivo libres de proteínas favorece el desarrollo embrionario (Pinyopummintr y

Bavister, 1996; Lee y col, 2004). Sus acciones biológicas son muy diversas pudiendo actuar como antioxidantes (Liu y Foote, 1995) y controlando el pH y la osmolaridad (Gardner, 1998). No obstante, el metabolismo de los aminoácidos produce amonio, que es nocivo para los embriones. Este efecto secundario obliga a renovar el medio cada dos o tres días (Thompson, 2000).

También se ha comprobado que los factores de crecimiento secretados por las células estimulan el desarrollo embrionario cuando se añaden a medios de cultivo definidos (Byrne y col, 2002; Sinclair y col, 2003). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) favorece la maduración nuclear y la segmentación (Rieger y col, 1998), así como el desarrollo embrionario (Sirisathien y col, 2003) y la síntesis de proteínas (Diaz-Cueto y Gerton, 2001; Byrne y col, 2002; Sirisathien y col, 2003). El factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y 2 (IGF-2) aumenta el porcentaje de blastocistos y el número de células (Byrne y col, 2002; Sirisathien y col, 2003) y reduce la apoptosis.

La utilización de sistemas de cultivo semidefinidos y definidos ha puesto de manifiesto que la tensión de oxígeno utilizada durante el cultivo es un factor crítico para el desarrollo embrionario (Lonergan y col 1999; Vanroose y col 2001). La elevada tensión de oxígeno afecta a la transición materno-cigótica incrementando la duración del cuarto ciclo celular (Lequarre y col, 2003). Además, la utilización de una baja tensión de oxígeno reduce la formación de radicales libres que afectan al desarrollo y metabolismo embrionario (Lane, 2001), provocan un incremento de la apoptosis (Yuan y col, 2003) y alteran la expresión génica (Harvey y col, 2004). Además, los embriones cultivados en una atmósfera con un 5% de oxígeno resisten mejor la criopreservación (Rizos y col, 2001). Sin embargo, el cultivo en una atmósfera con un 5% de oxígeno produce una reducción de la proporción de células de la masa celular interna (Fischer-Brown y col, 2002) aunque dicho efecto depende de la especie (Karagenc y col, 2004).

La tensión de oxígeno influye también en el desarrollo de los embriones después de la transferencia. Así se ha comprobado que los embriones producidos en una atmósfera con un 20 % de oxígeno tiene mayor peso que los producidos con un 5% (Iwata y col 2000) y los cotiledones tiene mayor tamaño

y área en los primeros (Fischer- Brown y col 2005), siendo especialmente marcado en el caso de los embriones cultivados en KSOM.

Algunos autores señalan que la utilización de un único medio durante todo el periodo de cultivo impide la consecución de buenos resultados. Ello es consecuencia de que las necesidades de los embriones cambian a lo largo de su desarrollo, por lo que se han diseñado sistemas de cultivo secuenciales, cuyos resultados parecen prometedores. El diseño de los medios secuenciales permite cambiar de piruvato, nutriente preferido durante las primeras segmentaciones, a glucosa cuando la demanda energética es mayor al producirse la blastulación y la diferenciación celular (Donnay y col, 1999; Thompson y Peterson, 2000; Houghton y Leese, 2004; Lopes y col, 2007; Harvey, 2007). Además, permiten ajustar la disponibilidad de aminoácidos amino añadiendo aminoácidos no esenciales durante las primeras etapas e incorporando los aminoácidos esenciales una vez producida la activación del genoma. La utilización de estos medios para cultivar embriones humanos mejora el porcentaje de blastocistos y la calidad de los mismos, permitiendo reducir el número de embriones transferidos y el riesgo de provocar gestaciones múltiples (Gardner y Lane, 2003). En la actualidad existen diferentes medios para el cultivo de embriones humanos tales como el G1.2/G2.2 (Gardner, 1994) y M1/M2 (Zollner y col, 2004). En la especie bovina se han utilizado el KSOM/SOF (Nedambale y col, 2004), eSOF-98/LSOF-98 (Thompson, 2000), SOF1/SOF2 (Steeves y Gardner, 1999a), y SOF-A/SOF-B (Gyu-Jin y col, 2007). Se ha propuesto la utilización comercial del sistema G1.2/ G2.2 para el cultivo de los embriones bovinos (Lane y col 2003a), sin embargo, su elevado coste limita su utilización.

Se han diseñado sistemas de cultivo en microfluidos, contruidos a escala de los embriones de los mamíferos. Estos sistemas permiten eliminar la mayor parte del trabajo al permitir automatizar los cambios en los medios de cultivo y reducen el estrés ambiental. Los embriones pueden ser movidos de una localización a otra simulando la migración del oviducto al útero ajustando el flujo de fluido (Glasgow y col, 2001; Wheeler y col, 2004). Las dimensiones de los sistemas de cultivo en microfluidos permiten que la cantidad de medio que rodea al embrión sea mucho más reducida (aproximadamente 0.125 µl) que la que se utiliza en los sistemas de cultivo estáticos (≈50 µl). Este reducido

volumen permite una manipulación muy precisa del ambiente que rodea a los embriones de forma estática o dinámica (Wheeler y col, 2004). El principal inconveniente del cultivo en microfluidos es la elección del plástico debido a sus diferentes grados de permeabilidad para el agua y los gases, lo que se puede solucionar reduciendo los canales de flujo y los volúmenes de medio (Thompson, 2007).

Sin embargo, estos medios todavía necesitan ser mejorados sensiblemente, puesto que el cultivo de los embriones bovinos producidos *in vitro* en el interior del oviducto incrementa notablemente la calidad de los mismos.



## OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El objetivo global de nuestro trabajo fue el de diseñar un procedimiento para la maduración in vitro de los ovocitos bovinos que les permita alcanzar la competencia durante este período, basado en la utilización de un medio de cultivo simple (SOF), una atmósfera con baja concentración de oxígeno (6%) y evitando la adición de productos de origen biológico de composición indefinida.

Nuestra hipótesis de trabajo es que utilizando el mismo medio básico y la misma atmósfera gaseosa durante todas las etapas del cultivo (maduración, fecundación y cultivo) y eliminando las sustancias de origen biológico, podremos obtener unos resultados más homogéneos y obtener unos embriones de mayor calidad.

Para lograrlo proponemos los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Eliminar del medio de maduración las fuentes proteicas habituales (FCS y BSA), ya que al ser sustancias muy complejas en su composición y/o estar contaminadas con sustancias de bajo peso molecular, transforman en indefinido cualquier medio de cultivo al que se añadan. Para ello se evaluará el efecto de la sustitución de las mismas por una macromolécula sintética, la polivinil pirrolidona (PVP-40).
- 2.- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa (1,5; 5,6 y 10 mM) en un medio simple utilizado durante la maduración de los ovocitos, sin suplementos proteicos y en una atmósfera con bajo contenido en O<sub>2</sub>, sobre la evolución nuclear y la producción de blastocistos.
- 3.- Evaluar el efecto del EGF cuando la maduración de los ovocitos se realiza en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%) y en ausencia de suero.
- 4.- Analizar el efecto de diferentes concentraciones de FSH humana recombinante (r-hFSH) incorporada a un medio simple, libre de proteínas y en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno, sobre la producción de blastocistos.

5.- Evaluar el efecto de la duración del periodo de maduración de los ovocitos bovinos cuando se realiza en presencia r-hFSH, en una atmósfera pobre en oxígeno y en ausencia de suplementos proteicos.

6.- Evaluar el efecto de la utilización de una atmósfera con baja tensión de oxígeno durante el cocultivo de los espermatozoides y los ovocitos bovinos sobre el porcentaje de blastocistos y calidad de los mismos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## I. PROCESO DE CULTIVO *IN VITRO*

### Obtención de los Ovocitos

Los ovarios fueron obtenidos inmediatamente después del sacrificio de hembras bovinas adultas en un matadero local, y transportados al laboratorio en un tiempo inferior a 90 minutos, a  $\sim 35^{\circ}\text{C}$  en 500 cc. de una solución de NaCl al 9% suplementada con un 10% de la solución Antibiótico-Antimicótico: Penicilina G 10000 U  $\text{ml}^{-1}$ , sulfato de estreptomicina 10 mg  $\text{ml}^{-1}$ , anfotericina B 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, A-5955). Al llegar al laboratorio los ovarios fueron lavados nuevamente con 500 cc de la misma solución a idéntica temperatura.

Los complejos cúmulo-ovocito, fueron extraídos mediante aspiración de los folículos con un tamaño comprendido entre 2 y 6 mm, utilizando una jeringa de 10 ml y una aguja de 18 G, y depositados en un tubo de fondo cónico de 50 ml (Falcon®, Franklin Lakes, NJ. USA).

Tras permitir la sedimentación del contenido durante 15 minutos se aspiró el sedimento mediante una pipeta Pasteur y se depositó en una placa de Petri de 92 x 17 mm (Nunc Roskilde, Dinamarca), para proceder a la búsqueda de los CCO, seleccionando solo aquellos que presentaban un cúmulo compacto, con tres o más capas de células de la granulosa, un citoplasma homogéneo y sin signos de picnosis.

### Maduración *In Vitro*

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Adrich, Madrid, España. Los medios de maduración, fecundación y cultivo fueron preparados con agua de calidad Milli-Q (18.2 M $\Omega\text{cm}$ ), esterilizados a través de filtros de acetato de celulosa, de 0.20  $\mu\text{m}$  Minisart® (Sartorius, 16534-K, Hannover, Alemania) y conservados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante un periodo máximo de dos semanas.

Los CCOs seleccionados fueron lavados tres veces en placas 35 x 10 mm (Nunc Roskilde, Dinamarca) en medio SOF-Hepes (Tabla 1), suplementado con 4 mg  $\text{ml}^{-1}$  de PVP-40 y 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina, y dos veces más en el medio utilizado durante la maduración, cuya composición variaba en función del

diseño experimental, tal y como será descrito posteriormente. Los CCO fueron depositados en grupos de 10 en el interior de microgotas de 50  $\mu\text{l}$ , dispuestas bajo aceite mineral específico para cultivo embrionario, en placas de Petri de 60 x 15 mm (Nunc Roskilde, Dinamarca). Estas gotas habían sido preincubadas en la estufa al menos durante 1 hora para equilibrar su temperatura y pH. La maduración se llevo a cabo durante 24 horas a 39 °C en la atmósfera gaseosa utilizada en cada experimento y máxima humedad relativa.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	107,7
KCl	7,16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19
NaHCO <sub>3</sub>	25,07
CaCl <sub>2</sub>	1,71
MgCl <sub>2</sub>	0,49
Ácido Láctico	3,3
Glucosa	1,5
Hepes	10

Tabla 5. Composición cuantitativa del medio SOF-Hepes

### Fecundación *In Vitro*

Una vez completado el periodo de maduración, los ovocitos fueron lavados tres veces en medio SOF-Hepes (Tabla 1), suplementado con 3 mg ml<sup>-1</sup> de BSA FAF, 0.2 mM de piruvato y 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina, y dos veces más en el medio de fecundación. El medio utilizado durante el periodo de fecundación fue el TL-Stock (Tabla 6) (Bavister y Yanagimachi, 1977) suplementado con 6 mg ml<sup>-1</sup> de BSA FAF, 0.2 mM de piruvato y 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina. Dicho medio fue equilibrado previamente en estufa al menos durante 2 horas antes de la incorporación de los ovocitos. Los ovocitos fueron colocados en gotas de 50  $\mu\text{l}$  del medio de fertilización, en grupos de 10, dispuestas bajo aceite mineral, en placas de Petri de 60 x 15 mm (Nunc Roskilde, Dinamarca), e incubados durante 1 hora antes de añadir los espermatozoides.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114,00
KCl	3,20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34
NaHCO <sub>3</sub>	25,00
CaCl <sub>2</sub>	2,00
MgCl <sub>2</sub>	0,50
Ácido Láctico	10,00

Tabla 6. Composición cuantitativa del medio de fecundación TL-Stock (Bavister y Yanagimachi, 1977).

El semen utilizado en todos los experimentos pertenecía a un mismo toro y un mismo eyaculado. Para obtener los espermatozoides se descongeló una pajuela de 0,25 ml, mediante inmersión en agua a 38,5° C durante 1 min. El contenido de la pajuela fue depositado en la superficie de un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (2 ml a 45% sobre 2 ml a 90%) preparado en un tubo de 15 ml con fondo cónico (Falcon® Franklin Lakes, NJ. USA), y centrifugado a 700 g durante 30 min a temperatura ambiente. La fracción superior fue retirada con una pipeta Pasteur, y el pellet restante fue resuspendido con el medio de fecundación, añadiendo el volumen necesario para obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  spz ml<sup>-1</sup>, en la gota de fecundación.

A cada una de las gotas de fecundación, en las que previamente se habían introducido los ovocitos, se añadieron: 2 µl de la suspensión de espermatozoides, 2 µl de una solución de heparina cuya concentración había sido previamente ajustada para lograr una concentración final de 2 µg ml<sup>-1</sup> y 2 µl de la solución PHE (penicilamina 20 µM, hipotaurina 10 µM, epinefrina 1 µM).

El cultivo conjunto de los espermatozoides y los ovocitos se mantuvo durante 18 horas a 39 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad relativa.

#### Cultivo *In Vitro*

Al concluir el periodo de fecundación, los presuntos zigotos fueron extraídos de las gotas y liberados de las células del cúmulo mediante 2 min. de agitación y sometidos a tres lavados en SOF-Hepes suplementado con 4 mg ml<sup>-1</sup>

de PVP-40 y  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina, y dos lavados más en el medio de cultivo. El medio utilizado para el cultivo fue SOF modificado (Tabla 7) (Takahashi y First, 1992) suplementado con un 5% de FCS, 0.3 mM de piruvato, 1 mM de L-glutamina, 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA,  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  de insulina,  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  de transferrina,  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  de selenito sódico,  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina.

El cultivo se llevo a cabo en grupos de 25 cigotos en gotas de  $50 \mu\text{l}$  que fueron preincubadas al menos 12 horas antes de depositar los mismos. El cultivo se mantuvo durante 10 días a  $39^\circ \text{C}$  en una atmósfera por 5%  $\text{CO}_2$ , 6%  $\text{O}_2$  y 89%  $\text{N}_2$  y máxima humedad.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	107,7
KCl	7,16
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,19
$\text{NaHCO}_3$	25,07
$\text{CaCl}_2$	1,71
$\text{MgCl}_2$	0,49
Ácido Láctico	3,3
Glucosa	1,5

Tabla 7. Composición cuantitativa del medio SOF-Cultivo

## II. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

### II.1. Evaluación de la maduración nuclear.

Al concluir el periodo de maduración los ovocitos fueron desprovistos de las células del cúmulo mediante agitación en presencia de 50 UI/ml de hialuronidasa, fijados en etanol:ácido acético (3:1) durante al menos 24 horas, depositados sobre un portaobjetos, cubiertos con un cubreobjetos soportado por una mezcla de parafina-vaselina y finalmente teñidos con aceto-orceina al 1% y examinados en un microscopio de contraste de fases. Los ovocitos fueron clasificados de acuerdo con la etapa de maduración nuclear en la que se encontraban: vesícula germinal, metafase I o metafase II.





Figura 7. Ovocito en fase de Vesícula Germinal

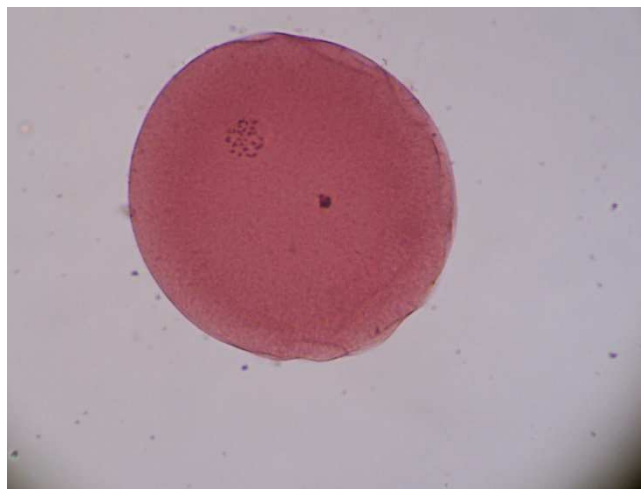


Figura 8. Ovocito en fase de Metafase I



Figura 9. Ovocito en fase de Metafase II

## II.2. Evaluación del desarrollo embrionario

Los resultados de desarrollo embrionario in vitro fueron evaluados de la siguiente manera:

Porcentaje de embriones divididos a las 48 horas: Número de embriones con 2 ó más células/Número de presuntos cigotos cultivados

Porcentaje de blastocistos (desde jóvenes a eclosionados) en los días 7, 8 y los totales: Número de blastocistos en cada uno de los días considerados/Número de presuntos cigotos cultivados.

Porcentaje de blastocistos eclosionados: Número de blastocistos que han abandonado la zona pelúcida/Número de blastocistos totales.

Para la obtención de estos valores hemos considerado como día cero (D0) el momento en el que se inicia el cocultivo de los ovocitos maduros con los espermatozoides, de acuerdo con la clasificación de la International Embryo Transfer Society (IETS, Robertson y Nelson, 1998).

## II.3. Determinación del número de núcleos

Para determinar el número total de células que compone cada uno de los blastocistos se utilizó el método de Pursel y col. (1985). Los blastocistos fueron lavados en PBS, fijados en etanol al 70% durante 24h y teñidos con una solución de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de bisbenzimida (Hoechst 33342). Las células son permeables a este fluorocromo que se une específicamente al ADN nuclear mediante la unión no covalente a los pares de bases A-T. La observación y evaluación se hace inmediatamente con un microscopio de fluorescencia. El fluorocromo genera fluorescencia de color azul cuando es excitado con una longitud de onda de 365 nm y los núcleos pueden fácilmente ser contados.

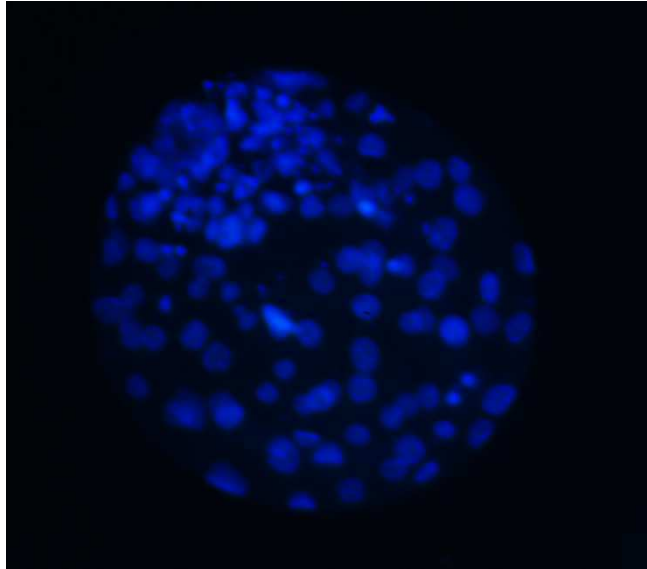


Figura 10. Imagen de un blastocisto teñido para conteo de núcleos

#### II.4. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois), comparando los valores obtenidos para cada una de las replicas de un mismo experimento, mediante un modelo lineal general multivariante, para excluir posibles diferencias entre ellas. Posteriormente, las medias fueron comparadas mediante el test de Tukey, considerando la existencia de significación estadística cuando el valor de  $p < 0,05$ .

### III. DISEÑO EXPERIMENTAL



Figura 11. Esquema de trabajo

**Experimento 1. Evaluación del efecto de la sustitución del suero en el medio de maduración por BSA o PVP-40**

Para realizar este experimento los CCOs empleados fueron divididos al azar en tres grupos, y cada uno de ellos fue madurado en presencia de una sustancia diferente. El medio de cultivo básico fue el mismo en todos los casos, SOF-maduración (Tabla 8) modificado mediante la incorporación de 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 50 µg/ml de gentamicina, 0.5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de hCG y 1 µg/ml de 17β-estradiol. Las diferencias entre los tres grupos eran consecuencia de la macromolécula incorporada: 1) 10% de FCS; 2) 8 mg/ml de BSA FAF o 3) 8 mg/ml de PVP-40.

La maduración se llevó a cabo cultivándolos durante 24 horas a 38,5 °C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, 6% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub> a 38,5° C y con la máxima humedad relativa. Una vez transcurrido ese período se procedió a la FIV y MIV

según se describió anteriormente. Este experimento fue replicado en cuatro ocasiones.

En una primera fase se evaluó el desarrollo embrionario de cada uno de los tratamientos propuestos, midiendo la tasa de división a las 48 horas, el porcentaje de blastocistos en el día 7, 8 y totales, así como el porcentaje de blastocistos eclosionados.

En una segunda fase del experimento se evaluó, para cada uno de los tratamientos, el número total de células que conformaba cada blastocisto usando el método de Pursel y col (1985) basado en la determinación del número de núcleos.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	107,7
KCl	7,16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19
NaHCO <sub>3</sub>	25,07
CaCl <sub>2</sub>	1,71
MgCl <sub>2</sub>	0,49
Ácido Láctico	3,3
Piruvato	0,3
L-Glutamina	1

Tabla 8. Composición cuantitativa del medio SOF-Maduración

**Experimento 2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de glucosa (1,5; 5,6 y 10 mM) cuando la maduración de los ovocitos se realiza en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%) y en ausencia de suero.**

Para ello, los CCOs obtenidos fueron divididos al azar en cuatro grupos (tres grupos experimentales y un grupo control). Los tres grupos experimentales fueron madurados en SOF de maduración (Tabla 8) suplementado con 8 mg/ml de PVP-40, 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 50 µg/ml de gentamicina, 0.5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de hCG y 1 µg/ml de 17β-estradiol y cultivados en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, 6% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub> a 38,5° C. La diferencia entre los tres grupos experimentales se basaba en la concentración de glucosa añadida al medio: 1,5; 5,6 y 10 mM. El grupo control será cultivado en el mismo medio de maduración, suplementado con glucosa 1,5 mM, utilizando una atmósfera con

un contenido de 5% CO<sub>2</sub> en aire y la misma temperatura. Este experimento fue repetido en tres ocasiones para evaluar la maduración nuclear y en otras tres ocasiones para evaluar el desarrollo y calidad de los embriones.

**Experimento 2.1.** Evaluación de la maduración nuclear: la evolución nuclear fue determinada a las 6, 12, 16, 20, 22 y 24 horas utilizando el protocolo anteriormente descrito, utilizando un mínimo de 20 ovocitos por cada tiempo en cada uno de los tratamientos.

**Experimento 2.2.** Evaluación del desarrollo embrionario. Los ovocitos destinados a evaluar el desarrollo embrionario fueron madurados durante 24 horas y posteriormente fecundados y cultivados utilizando los procedimientos anteriormente descritos. En cada grupo se determinará el porcentaje de embriones con 2 ó más células a las 48 pi y el porcentaje de blastocistos en los días 7 y 8 pi., el porcentaje de blastocistos en función del número de ovocitos.

**Experimento 3.** Evaluación del efecto del EGF cuando la maduración de los ovocitos se realiza en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%) y en ausencia de suero.

Para ello, los complejos cúmulo ovocito obtenidos fueron divididos al azar en tres grupos. El medio utilizado para el cultivo durante la maduración fue SOF de maduración (Tabla 8) suplementado con 8 mg/ml de PVP-40, 10 mM de glucosa, 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 50 µg/ml de gentamicina y en todos los casos fueron cultivados en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, 6% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub> a 38,5° C. Uno de los grupos experimentales fue madurado en presencia de hormonas (0.5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de hCG y 1 µg/ml de 17β-estradiol), mientras que el otro fue madurado en presencia de 100 ng/ml de EGF. El grupo control fue madurado en el mismo medio de cultivo y condiciones de cultivo pero sin incorporar hormonas ni EGF.

Los ovocitos fueron madurados durante 24 horas y posteriormente fecundados y cultivados utilizando los procedimientos anteriormente descritos. En cada grupo se determinó el porcentaje de embriones con 2 ó más células a las 48 p.i., el porcentaje de blastocistos en los días 7 y 8 pi. y el porcentaje de

eclosión una vez transcurrido el período de cultivo in vitro en función de los blastocistos obtenidos.

**Experimento 4. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de r-hFSH cuando la maduración de los ovocitos bovinos se realiza en una atmósfera pobre en oxígeno y en ausencia de suero.**

Los COCs obtenidos fueron divididos en cuatro grupos y cultivados en SOF de maduración (Tabla 8) suplementado con 8 mg ml<sup>-1</sup> de PVP-40, 10 mM de glucosa, 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 50 µg/ml de gentamicina y en todos los casos fueron cultivados en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, 6% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub> a 38,5° C. Los tres grupos experimentales fueron madurados en dicho medio suplementado con 1, 0,5 ó 0,01 IU/ml de r-hFSH (Gonal F, Serono España). El grupo control fue madurado en las mismas condiciones atmosféricas usando en este caso un medio suplementado con hormonas: FSH (0.5 µg/ml), hCG (10 µg/ml) y 17β-estradiol (µg/ml).

Los ovocitos resultantes fueron fecundados y los cigotos cultivados de acuerdo a los procedimientos descritos en la metodología general. Este experimento se repitió en cuatro ocasiones y en cada grupo determinó el porcentaje de embriones con 2 ó más células a las 48 pi y el porcentaje de blastocistos en los días 7 y 8 pi., el porcentaje de eclosión y número total de células que forman el blastocisto.

**Experimento 5. Evaluación de la duración del periodo de MIV en presencia r-hFSH, en una atmósfera pobre en oxígeno y en ausencia de suero.**

Los COCs obtenidos fueron divididos en tres grupos y cultivados en SOF de maduración (Tabla 8) suplementado con 8 mg/ml de PVP-40, 10 mM de glucosa, 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 50 µg/ml de gentamicina, y 1 UI/ml de r-hFSH (Gonal F, Serono España) y en todos los casos fueron cultivados en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, 6% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub> a 38,5° C. La diferencia entre los tres grupos experimentales radicó en la duración del periodo de maduración empleado, siendo de 24, 28 y 32 horas para cada uno de los grupos. Los ovocitos resultantes fueron fecundados y los cigotos cultivados de acuerdo a los procedimientos descritos en la metodología general. Este

experimento se replicó en cuatro ocasiones y en cada grupo se determinó el porcentaje de embriones con 2 ó más células a las 48 hpi y el porcentaje de blastocistos en los días 7 y 8 pi, así como el porcentaje de eclosión total. También se evaluó el porcentaje de blastocistos eclosionados el día 8.

#### Experimento 6. Evaluación del efecto de la fecundación in vitro en una atmósfera con baja concentración de oxígeno.

En este experimento se evaluó el impacto de la concentración de oxígeno durante el periodo de fecundación in vitro. Para ello los ovocitos maduros se dividieron en dos grupos experimentales cuya única diferencia se basó en la concentración de oxígeno en la atmosfera empleada durante la fecundación in vitro que en un grupo fue del 20% y en el otro del 6% de O<sub>2</sub>. Para la maduración in vitro se empleo del medio SOF de maduración (Tabla 4) suplementado con 8 mg ml<sup>-1</sup> de PVP-40, 10 mM de glucosa, 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 50 µg/ml de gentamicina, y 1 UI/ml de r-hFSH (Gonal F, Serono España) y en todos los casos fueron cultivados en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, 6% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub> a 38,5° C.

Los ovocitos fueron madurados durante 24 horas y posteriormente fecundados y cultivados utilizando los procedimientos anteriormente descritos. En cada grupo se determinó el porcentaje de embriones con 2 ó más células a las 48 pi y el porcentaje de blastocistos en los días 7 y 8 pi., y el porcentaje de eclosión en el día 8.



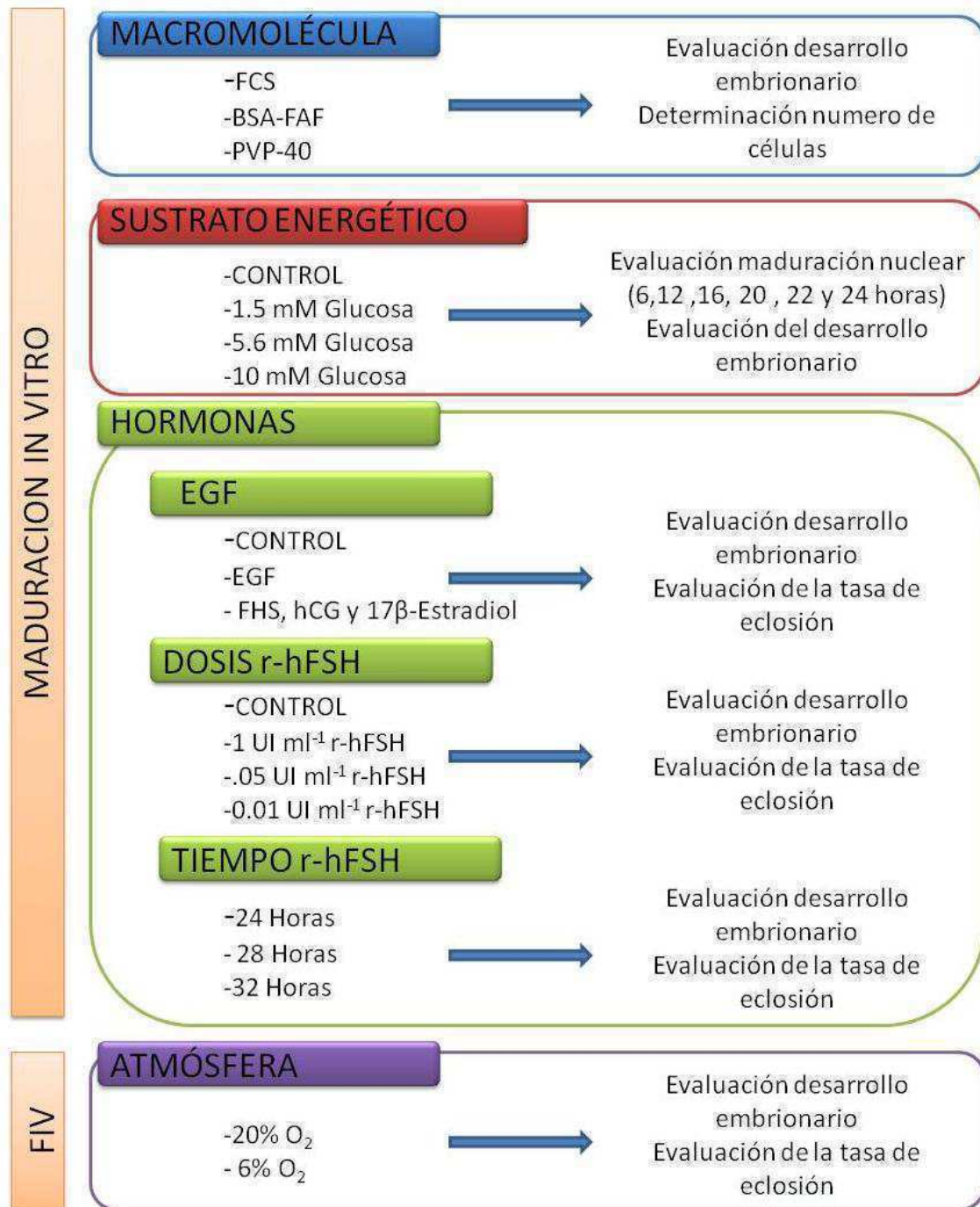


Figura 12. Diseño experimental

## RESULTADOS

## Experimento 1. Evaluación del efecto de la sustitución del suero en el medio de maduración

Para efectuar este experimento se realizaron 4 replicas, utilizando un total de 622 CCOs que fueron divididos al azar y madurados en SOF suplementado con tres macromoléculas diferentes FCS (n=204), BSA (n=207) y PVP-40 (n=211).

En la primera parte de este experimento, los 622 CCO fueron madurados *in vitro* (IVM) en medio de maduración suplementado con tres fuentes distintas de macromoléculas. Una vez fertilizados fueron transferidos al medio de cultivo y evaluados a las 48 horas para determinar la tasa de división para cada uno de los grupos. El análisis estadístico de los resultados indicó que no había diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos experimentales ni en la tasa de división (76.43, 67.99 Y 71.84% para FCS, BSA y PVP-40 respectivamente) ni en el número de blastocistos obtenidos tras 8 días de cultivo (28.63% para FCS, 23.99% para BSA y 25.20% para PVP-40) (Tabla 9). Sin embargo, la macromolécula presente en el medio de maduración provocaba diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) en el porcentaje de blastocistos eclosionados, mostrando una mayor tasa de eclosión en el grupo madurado en presencia de FCS (74.82%) y PVP-40 (65.71%) frente a los madurados en un medio con BSA (43.12%) (ver Tabla 9).

Tratamiento	N	% División	% BL/oocitos inseminados			
			Día 7	Día 8	Totales	% BLEcl
FCS	204	76.43 $\pm$ 2.40	22.94 $\pm$ 4.23	5.69 $\pm$ 4.90	28.63 $\pm$ 4.97	74.82 $\pm$ 2.97 <sup>a</sup>
BSA	207	67.99 $\pm$ 8.29	14.19 $\pm$ 7.40	9.80 $\pm$ 4.50	23.99 $\pm$ 10.30	43.12 $\pm$ 16.79 <sup>b</sup>
PVP-40	211	71.84 $\pm$ 6.49	15.50 $\pm$ 2.78	9.70 $\pm$ 5.26	25.20 $\pm$ 4.78	65.71 $\pm$ 8.08 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ )

Tabla 9. Efecto de la macromolécula empleada en el medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos eclosionados (% BLEcl)

El número medio de núcleos de los blastocistos obtenidos en un medio de maduración suplementado con PVP-40 era ligeramente inferior a los

producidos con los otros dos medios, aunque las diferencias carecían de significación estadística.

Maduración	Número de células	N
FCS	122 ±32	22
BSA	126 ±37	15
PVP-40	109 ±29	22

Tabla 10. Efecto de la macromolécula empleada en el medio de MIV sobre el número de células presentes en los blastocistos

**Experimento 2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de glucosa (1,5; 5,6 y 10 mM) cuando la maduración de los ovocitos se realiza en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%) y en ausencia de suero.**

Para efectuar este experimento se emplearon un total de 2008 CCOs que fueron divididos al azar y madurados en SOF suplementado en un medio de maduración con tres concentraciones diferentes de glucosa, 1.5 mM (509 CCO), 5.6 mM (488 CCO) y 10 mM (510 CCO), así como en un grupo control anteriormente descrito (501 CCO).

**Experimento 2.1. Evaluación de la maduración nuclear:** se han realizado tres réplicas para este experimento, empleando un total de 636 CCOs repartidos en los 4 tratamientos, con un mínimo de 20 ovocitos por grupo y tratamiento.

La primera determinación de la evolución nuclear se realizó a las 6 horas de maduración, observándose que el porcentaje de ovocitos que mantenían una vesícula germinal intacta era mayor en el grupo madurado con una concentración de glucosa 1.5 mM (70.09%), seguido del grupo control (48.14%) y, siendo significativamente más baja en los grupos en los que la concentración de glucosa era más elevada (8.46% para 5.6 mM y 3.33% para 10 mM), siendo las diferencias observadas estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). De forma paralela hemos encontrado que el porcentaje de ovocitos en metafase I era elevado para los grupos de 10 mM (49.04%) y 5.6 mM (37.56%), mientras que en los otros dos grupos no había ovocitos en metafase I.

Tratamiento	N	6 horas de maduración			
		GV	GVBD	MI	MII
Control	25	48,14 ± 3.20 <sup>a</sup>	51.85 ± 3.20	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	-
1.5	27	70.09 ± 7.63 <sup>b</sup>	29.90 ± 7.63	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	-
5.6	23	8.46 ± 7.50 <sup>c</sup>	53.96 ± 19.24	37.56 ± 21.13 <sup>b</sup>	-
10	27	3.33 ± 5.77 <sup>c</sup>	47.61 ± 4.12	49.04 ± 8.61 <sup>b</sup>	-

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Tabla 11. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 6 horas

Una vez transcurridas 12 horas de maduración se procedió a una nueva evaluación de la cinética de maduración nuclear. Lo primero que observábamos fue que en el grupo madurado en un medio con una concentración de glucosa de 1.5 mM aún había ovocitos en fase de vesícula germinal, mientras que el resto de los grupos se había completado la rotura de la vesícula germinal (GVBD) en todos los ovocitos y un elevado porcentaje de los mismos estaban en metafase I. Las diferencias en el porcentaje de ovocitos en fase de GVBD mostraba diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ), observándose un mayor porcentaje en el grupo de 1.5 mM (40%), frente al grupo control (15.99%) y a la ausencia de ovocitos en esta etapa evolutiva en los grupos madurados con una concentración de glucosa de 5.6 y 10 mM. De la misma manera, se observó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de ovocitos en las fases más avanzadas de evolución nuclear, pudiéndose comprobar que el caso de los madurados en medios con concentraciones de 5.6 y 10 mM de glucosa la totalidad de los mismos se hallaban en metafase I, mientras que en grupo control solo habían alcanzado esta etapa el 84% de los mismos y la cifra se reducía hasta el 53.33% en el grupo madurado con un 1.5 mM de glucosa.

Tratamiento	N	12 horas de maduración			
		GV	GVBD	MI	MII
Control	26	0.00 ± 0.00	15.99 ± 6.59 <sup>a</sup>	84.00 ± 6.59 <sup>a</sup>	-
1.5	28	6.66 ± 5.77	40.00 ± 10.00 <sup>b</sup>	53.33 ± 5.77 <sup>b</sup>	-
5.6	28	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	-
10	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	-

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Tabla 12. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 12 horas.

Las diferencias en la velocidad con la que evoluciona la maduración fueron menos evidentes a las 16 horas de maduración (Tabla 13), observándose únicamente diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) en el porcentaje de ovocitos que se mantenían en fase de GVBD en los madurados en un medio con una concentración de glucosa 1.5 mM (22.50%) mientras que estaban ausentes en el resto de los grupos experimentales. A las 20 horas de maduración hemos observado unos porcentajes de ovocitos en metafase II más elevados en los grupos control, 5.6 y 10 mM que en el grupo madurado con 1.5 mM de glucosa, siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) (Tabla 14).

Una vez transcurridas 22 de maduración, los porcentajes de ovocitos con una evolución nuclear más retrasada se correspondían al grupo madurado con una concentración de glucosa 1.5 mM (Tabla 15), siendo las diferencias existentes con los restantes grupos estadísticamente significativas, salvo para el porcentaje de ovocitos en metafase I, donde no se ha hallado diferencias con los ovocitos madurados en 5.6 mM, pero sí con el resto. Otro dato interesante que el porcentaje de ovocitos en Metafase II a las 16, 20 y 22 horas siempre correspondía al grupo control, si bien las diferencias observadas con los grupos de 5.6 y 10 mM carecían de significación estadística.

Tratamiento	N	GV	16 horas de maduración		
			GVBD	MI	MII
Control	28	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	78.14 ± 11.67	18.14 ± 13.16
1.5	28	-	22.50 ± 13.91 <sup>b</sup>	67.50 ± 10.89	3.33 ± 5.77
5.6	28	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	87.57 ± 13.79	12.42 ± 13.79
10	28	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	86.66 ± 23.09	10.00 ± 17.32

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ )

Tabla 13. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 16 horas.

Tratamiento	N	GV	20 horas de maduración		
			GVBD	MI	MII
Control	29	-	-	20.74 ± 10.08	75.55 ± 12.61 <sup>a</sup>
1.5	28	-	23.33 ± 23.09	44.16 ± 27.42	29.16 ± 8.77 <sup>b</sup>
5.6	27	-	-	32.77 ± 7.51	67.22 ± 7.51 <sup>a</sup>
10	27	-	3.03 ± 5.24	29.92 ± 6.65	67.04 ± 6.91 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ )

Tabla 14. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 20 horas

Tratamiento	N	GV	22 horas de maduración		
			GVBD	MI	MII
Control	28	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	11.11 ± 11.11 <sup>a</sup>	88.88 ± 11.11 <sup>a</sup>
1.5	27	-	11.20 ± 1.25 <sup>b</sup>	48.05 ± 16.16 <sup>b</sup>	28.70 ± 19.70 <sup>b</sup>
5.6	21	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	18.65 ± 5.62 <sup>a,b</sup>	81.34 ± 5.62 <sup>a</sup>
10	26	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	14.07 ± 12.23 <sup>a</sup>	85.92 ± 12.23 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Tabla 15. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 22 horas.

Una vez concluido el período de maduración se ha encontrado que los correspondientes al grupo control y a los madurados en 10 mM de glucosa presentaban un porcentaje de ovocitos en metafase II muy superior a los otros dos grupos, siendo esta distribución extrapolable también a los ovocitos que se mantenían en metafase I (Tabla 16). Otro dato significativo es que, una vez concluido el período de maduración, en el grupo madurado en presencia de una concentración de glucosa 1.5 mM continuaban existiendo ovocitos en fase de GVBD, situación no observada en ninguno de los otros grupos.

Tratamiento	N	GV	24 horas de maduración		
			GVBD	MI	MII
Control	24	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	3.33 ± 5.77 <sup>a</sup>	96.66 ± 5.77 <sup>a</sup>
1.5	27	-	11.42 ± 2.47 <sup>b</sup>	52.38 ± 4.12 <sup>b</sup>	36.19 ± 6.59 <sup>b</sup>
5.6	25	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	24.07 ± 1.60 <sup>c</sup>	75.92 ± 1.60 <sup>c</sup>
10	26	-	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	11.66 ± 1.44 <sup>a</sup>	88.33 ± 1.44 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Tabla 16. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre la maduración nuclear a las 24 horas.

La evolución de la maduración nuclear está condicionada por la concentración de glucosa presente en el medio de maduración cuando esta se produce con una concentración de O<sub>2</sub> del 6%, de manera que cuanto mayor es la concentración de glucosa más se asemeja la evolución nuclear a la observada en el grupo control. Además, la velocidad con la que evoluciona el núcleo y el porcentaje de ovocitos que han alcanzado la metafase II una vez concluido el

período de maduración son más elevados cuanto mayor era la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo.

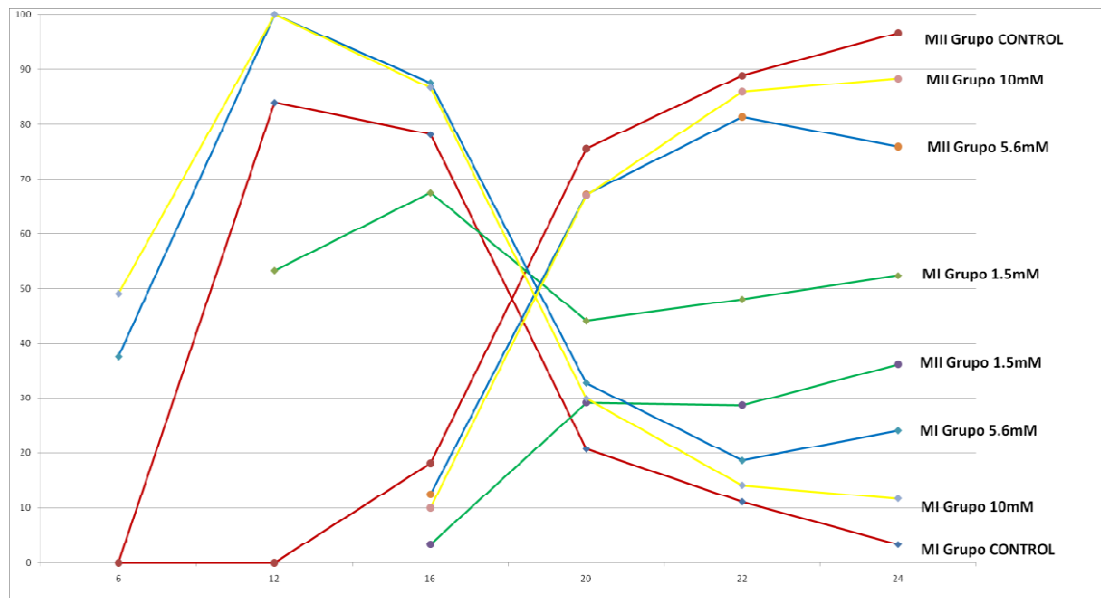


Figura 13. Evolución de la maduración nuclear en función de la concentración de glucosa presente en el medio de maduración.

**Experimento 2.2. Evaluación del desarrollo embrionario.** Este experimento se replicó en tres ocasiones, utilizando un total de 1372 CCO, asignados al azar a los mismos 4 grupos de tratamiento de maduración: control (n=341), 1.5 mM (n=344), 5.6 mM (n=336) y 10 mM de glucosa (n=351).

Los resultados obtenidos indicaban que el porcentaje de divididos a las 48 horas pi era inferior en el grupo de embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en un medio con 1.5 mM de glucosa (44.66%) que en los restantes grupos (66.17%, 56.79% y 69.50% para los grupos control, 5.6 y 10 mM de glucosa respectivamente).

En cuanto al porcentaje de blastocitos se ha observado una mayor proporción de blastocistos en el día 7 para los grupos control (18.55%) y 10 mM de glucosa (17.25%) frente a los obtenidos a partir de ovocitos madurados en medios con 1.5 y 5.6 mM de glucosa (4.66 y 8.93%, respectivamente) ( $p < 0.05$ ). Estas diferencias se mantuvieron también en la proporción de blastocistos en el día 8 y en el porcentaje de blastocistos totales, si bien las diferencias únicamente fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al considerar los porcentajes de



blastocistos totales, encontrando unos valores más elevados en los grupos de 10 mM de glucosa (25.87%) y control (24.99%), intermedios en el de 5.6 mM de glucosa (14.82%) y notablemente inferiores cuando la concentración glucosa en el medio de maduración era de 1.5 mM de (8%), existiendo también diferencias estadísticamente significativas también entre estos dos últimos (Tabla 17).

Cuando considerábamos solamente los embriones divididos para evaluar el porcentaje de blastocistos totales, pudimos comprobar que los valores más elevados fueron obtenidos a partir de ovocitos madurados en un medio con una concentración de glucosa 10 mM (38.54%), frente a los grupos control (37.39%) y de 5.6 mM (26.77%). El grupo con menor porcentaje de blastocistos continuaba siendo el de los embriones procedentes de ovocitos madurados en medios con 1.5 mM de glucosa (17.92%).

Tratamiento	N	% División	% BL/ovocitos inseminados		Totales	%BL/ovocitos divididos
			Día 7	Día 8		
Control	341	66.17 ± 14.67 <sup>a</sup>	18.55 ± 10.18 <sup>a</sup>	6.44 ± 6.57	24.99 ± 9.98 <sup>a,b</sup>	37.39 ± 9.61 <sup>a,b</sup>
1.5	344	44.66 ± 16.93 <sup>b</sup>	4.66 ± 5.48 <sup>b</sup>	3.33 ± 4.71	8.00 ± 9.83 <sup>c</sup>	17.92 ± 23.59 <sup>b</sup>
5.6	336	56.79 ± 11.40 <sup>a</sup>	8.93 ± 5.67 <sup>a,b</sup>	5.88 ± 5.12	14.82 ± 6.29 <sup>b,c</sup>	26.77 ± 11.61 <sup>a,b</sup>
10	351	69.50 ± 15.19 <sup>a</sup>	17.25 ± 10.55 <sup>a</sup>	8.62 ± 8.92	25.87 ± 7.45 <sup>a</sup>	38.54 ± 13.54 <sup>c</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Tabla 17. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 horas postinseminación (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos sobre los ovocitos divididos (% BL/ovocitos divididos).

En resumen, a medida que se aumentan las cantidades de glucosa en el medio de maduración, los porcentajes de división y producción de blastocistos se asemejan al medio control, de tal manera que con 10 mM de glucosa se han obtenido las mayores tasas de división a las 48 horas pi (69.5%) y los mayores porcentajes de obtención de blastocistos totales (25.87%) y blastocistos totales sobre divididos (38.54%), si bien las diferencias con el grupo control carecían de significación estadística para todos los indicadores evaluados. Esas diferencias aparecieron al comparar el grupo correspondiente a 10 mM con el resto de los tratamientos efectuados (Tabla 17).

### Experimento 3. Evaluación del efecto del EGF (Epidermal Growth Factor) cuando la maduración de los ovocitos se realiza en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%) y en ausencia de suero

Para la realización de este experimento se efectuaron 5 replicas utilizando un total de 840 COCs, que fueron asignados al azar a cada uno de los tres tratamientos considerados: mSOF-Hormonas (n=293), mSOF-EGF (n=281) y mSOF (n=266).

Al completarse el periodo de maduración pudimos constatar la existencia de diferencias en el grado de expansión del cúmulo entre los tres grupos considerados. Así, los ovocitos madurados en presencia de hormonas (mSOF-hormonas) y EGF (mSOF-EGF) presentaron una buena expansión de las células del cúmulo, mientras que en los madurados en ausencia de estos compuestos no se produjo la expansión del cúmulo. Sin embargo, esta no fue la única diferencia observada, ya que análisis estadístico de los datos obtenidos indicó un mayor porcentaje de blastocistos totales en el grupo cultivado en un medio de maduración suplementado con hormonas (26.47%) frente a los grupos en los que se incorporó EGF o no se utilizó ningún suplemento (19.57 y 18.17% respectivamente), siendo los valores muy similares en estos dos últimos grupos.

Tratamiento	N	% División	% BL/oocitos inseminados			%BL/oocitos
			Día 7	Día 8	Totales	divididos
Hormonas	293	67.31 ± 9.32	19.17 ± 5.74	7.31 ± 5.91	26.47 ± 7.78 <sup>a</sup>	39.17 ± 9.90
EGF	281	71.80 ± 8.86	13.75 ± 5.29	5.82 ± 3.84	19.57 ± 3.24 <sup>b</sup>	27.40 ± 4.29
Sin supl.	266	69.27 ± 10.08	11.16 ± 5.31	7.01 ± 4.89	18.17 ± 7.62 <sup>b</sup>	26.06 ± 9.53

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,03$ )

Tabla 18. Efecto de la adición de EGF o de Hormonas al medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 hpi (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos sobre los ovocitos divididos (% BL/ovocitos divididos).

Cuando se evaluó el porcentaje de blastocistos eclosionados a los 10 días p.i. (Tabla 19), el mayor porcentaje de eclosión se obtuvo en el grupo de blastocistos madurados en un medio de cultivo libre de suplementos (60.02%). Sin embargo las diferencias observadas con los otros dos tratamientos carecían

de significación estadística (48% de eclosión para los madurados en el grupo de SOF-Hormonas y 41.78% para los del grupo SOF-EGF).

Porcentaje de blastocistos eclosionados a los día 10 pi.		
Maduración	%	N
Hormonas	48.00 ± 12.72	60
EGF	41.78 ± 22.77	52
Sin supl.	60.02 ± 18.49	42

*No hay diferencias significativas para los diferentes tratamientos*

Tabla 19. Efecto de la adición de EGF o de Hormonas en el medio de MIV sobre el porcentaje de blastocistos eclosionados.

#### Experimento 4. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de FSH humana recombinante (r-hFSH) cuando la maduración de los ovocitos bovinos se realiza en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno y en ausencia de suero.

Para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de r-hFSH sobre la maduración de los ovocitos bovinos en una atmósfera pobre en oxígeno y en ausencia de suero, se analizaron los resultados obtenidos mediante 3 tratamientos con diferentes concentraciones de r-hFSH (1, 0.5 y 0.01 UI/ml) en el medio de maduración y se compararon con un grupo control que estaba suplementado con: FSH (0.5 µg/ml), hCG (10 µg/ml) y 17β-estradiol (1 µg/ml). Para ello se utilizaron 759 CCO que fueron asignados al azar a cada uno de los grupos anteriormente reseñados.

El análisis estadístico de los datos obtenidos indicó que las mayores tasas de división se obtuvieron en los grupos control (64.88%) y en el madurado en presencia de 1 UI/ml de rh-FSH (67.39%), frente al grupo de ovocitos madurados con 0.5 UI/ml (47.61%). Sin embargo el grupo de 0.01 UI/mL, teniendo un menor porcentaje de división intermedio (ver Tabla 20), no mostró diferencias en cuanto a las tasas de división con el resto de los grupos considerados.

Estos mismos resultados fueron encontrados para el resto de las variables analizadas, siendo el grupo de ovocitos madurados en presencia de 1 UI/ml de r-hFSH en el que se obtuvieron mayores porcentajes de blastocistos en los días 7

(16.95%) y 8 (9.35%), si bien las diferencias únicamente mostraron significación estadística ( $p < 0.05$ ) cuando evaluamos el porcentaje de blastocistos totales. En el grupo madurado en 1 UI/ml de r-hFSH este valor fue de 26.31%, frente al 15.30% y 16% de los grupos control y 0.01 UI/ml respectivamente, mientras que en los madurados en 0.5 UI/ml el porcentaje de blastocistos totales fue tan solo de 11.19%.

El análisis de los porcentajes de blastocistos en función de los ovocitos divididos en cada uno de los grupos demostró también que la mayor proporción se obtenía en el grupo de 1 UI, a pesar de que también era el grupo con un valor más elevado para tasa de división, frente al resto de los grupos, si bien estas diferencias carecían de significación estadística.

Tratamiento	N	% División	% BL/ovocitos inseminados			%BL/ovocitos divididos
			Día 7	Día 8	Totales	
Control	172	64.88 ± 13.96 <sup>a</sup>	7.90 ± 7.52	7.39 ± 9.06	15.30 ± 9.04 <sup>a,b</sup>	22.52 ± 16.54
1 UI	215	67.39 ± 15.10 <sup>a</sup>	16.95 ± 13.61	9.35 ± 8.16	26.31 ± 15.53 <sup>b</sup>	38.85 ± 15.52
0,5 UI	187	47.61 ± 15.94 <sup>b</sup>	7.51 ± 8.78	4.99 ± 4.23	11.19 ± 9.03 <sup>a</sup>	23.23 ± 15.08
0,01 UI	185	57.92 ± 14.78 <sup>a,b</sup>	11.01 ± 9.12	11.93 ± 6.89	16.00 ± 9.85 <sup>a,b</sup>	28.28 ± 16.54

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Tabla 20. Efecto de la concentración de r-hFSH en el medio de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 hpi (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos sobre los ovocitos divididos (% BL/ovocitos divididos).

Los blastocistos obtenidos fueron mantenidos en cultivo hasta los 10 días postinseminación para evaluar el porcentaje de blastocistos que continúan su evolución y eclosionan, encontrando un valor más elevado para este parámetro en los blastocistos procedentes del grupo control y del grupo madurado en presencia de 1 UI/mL de r-hFSH (ver Tabla 21), frente a los otros dos grupos. Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados no permitió detectar significación estadística al comparar los valores obtenidos en los distintos grupos.

Porcentaje de blastocistos eclosionados a los 10 dpi		
Maduración	%	N
Control	40.00 ± 25.76	36
1 UI	35.00 ± 40.70	17
0,5 UI	15.55 ± 19.91	25
0,01 UI	16.87 ± 25.20	18
<i>No hay diferencias significativas para los diferentes tratamientos</i>		

Tabla 21. Efecto de la concentración de r-hFSH en el medio de MIV sobre el número de blastocistos eclosionados a los 10 dpi

### Experimento 5. Evaluación del efecto de la duración del periodo de maduración de los ovocitos bovinos cuando se realiza en presencia r-hFSH, en una atmósfera pobre en oxígeno y en ausencia de suero.

Una vez determinado mediante el ensayo anterior cual es la concentración de r-hFSH que permitía obtener una mejor respuesta, se procedió evaluar los posibles efectos de la duración del periodo de maduración sobre la producción de blastocistos. Para ello se establecieron dos grupos experimentales y uno control. En el grupo control la duración del periodo de maduración fue el habitual, 24 horas, y en los experimentales se prolongó durante 28 y 32 horas. Este experimento se replicó en cuatro ocasiones utilizando un total de 1269 CCO.

El análisis de los datos obtenidos utilizando un modelo general lineal indicó que los valores obtenidos para la tasa de división mostraban diferencias estadísticamente significativas entre el grupo madurado durante 32 horas con respecto a los otros dos considerados: control y 28 horas, ( $p < 0.01$ ). La mayor parte de los parámetros considerados presentaron valores significativamente superiores en el grupo control, con la excepción de los porcentajes de cigotos divididos y de blastocistos eclosionados, que fueron superiores en el grupo madurado durante 28 horas (Tabla 22).

Estos resultados indican que la prolongación del periodo de maduración por encima de las 24 horas no permite incrementar los resultados.

Tratamiento	N	% División	% BL/oocitos inseminados			
			Día 7	Día 8	Totales	Eclosionados
24 horas	511	80,58 ± 2,72 <sup>x</sup>	23.04 ± 7,47 <sup>a</sup>	12.91 ± 3.62 <sup>a,x</sup>	35.96 ± 6.24 <sup>x</sup>	6,48 ± 3,55 <sup>a</sup>
28 horas	326	84.48 ± 2,03 <sup>x</sup>	11.68 ± 3.09 <sup>b</sup>	8.37 ± 1.04 <sup>b</sup>	20.04 ± 3.26 <sup>y</sup>	24,46 ± 14,10 <sup>b</sup>
32 horas	432	72.23 ± 2.96 <sup>y</sup>	14.90 ± 1.63 <sup>a,b</sup>	4.84 ± 0.63 <sup>b,y</sup>	19.52 ± 1.52 <sup>y</sup>	17,71 ± 3,15 <sup>a,b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

<sup>x,y</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ )

Tabla 22. Efecto de la duración de la fase de MIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 hpi (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos eclosionados (% BLEcl).

## Experimento 6. Evaluación del efecto de la fecundación in vitro en una atmósfera con un bajo contenido de oxígeno (6%).

En este último ensayo se evaluó el efecto de la concentración de oxígeno durante la fase de fecundación in vitro, planteándose el empleo de una concentración del 6% de O<sub>2</sub> frente al 20% de O<sub>2</sub> utilizado de manera tradicional durante la FIV. Para ello se han utilizado un total de 883 CCO asignados al azar a los 2 grupos antes señalados y realizándose cuatro réplicas del ensayo.

Los resultados obtenidos indicaron la existencia de unas tasas de división a las 48 horas y de blastocistos en el día 7 y totales superiores en el grupo de ovocitos fecundados en 6% de O<sub>2</sub> (ver Tabla 23). El análisis estadístico de los blastocistos eclosionados el día 8 indican una mayor proporción de blastocistos eclosionados en el grupo fecundado en 6% de O<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ )

Tratamiento	N	% División	% BL/oocitos inseminados			
			Día 7	Día 8	Totales	Eclosionados
20% O <sub>2</sub>	436	81.14 ± 4.75 <sup>*</sup>	24.76 ± 2.13 <sup>*</sup>	10.75 ± 1.33	35.52 ± 3.38 <sup>*</sup>	6,91 ± 3,13 <sup>**</sup>
6% O <sub>2</sub>	447	87.82 ± 2.18	29.02 ± 1.26	11.97 ± 1.02	40.99 ± 2.19	25,76 ± 2,95

<sup>\*</sup> Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

<sup>\*\*</sup> Diferencias significativas ( $p < 0,01$ )

Tabla 23. Efecto de concentración de O<sub>2</sub> en la FIV sobre los porcentajes de cigotos divididos 48 hpi (% división), de blastocistos tanto a los 7 y 8 días y blastocistos totales (Día 7, Día 8, Totales) y de blastocistos eclosionados (% BLEcl).

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

Desde 1981, año en el que nació el primer ternero procedente de un embrión bovino producido *in vitro*, hasta la actualidad se han producido numerosos cambios en los procedimientos utilizados durante la maduración, la fecundación y el cultivo *in vitro* de los ovocitos bovinos. Estos cambios han determinado un sensible incremento en la eficiencia de esta técnica, sin embargo el potencial de desarrollo de estos embriones continúa siendo menor que el de los producidos *in vivo*. Por lo tanto, sería de gran interés desarrollar un sistema de PIV más adecuado, para incrementar la eficiencia de la técnica en cuanto al porcentaje de blastocistos obtenidos y la calidad de los mismos. Ello facilitaría la utilización de esa biotecnología con fines científicos y comerciales.

Un punto clave para mejorar la eficiencia de la PIV de embriones bovinos es determinar cual son sus necesidades y su respuesta a los cambios en la disponibilidad de nutrientes y de la composición del medio ambiente que los rodea. Durante las dos últimas décadas se ha prestado gran atención a las condiciones de cultivo *in vitro* (CIV) y se encontraron numerosas evidencias de que las condiciones de cultivo afectan a la morfología embrionaria (Abe y col. 1999), a la incidencia de apoptosis (Byrne y col. 1999) y a la expresión de algunos genes que tienen una importante intervención durante el desarrollo (Wrenzycki y col. 2005). Sin embargo, existen algunas evidencias que sugieren que el periodo de maduración *in vitro* ejerce un fuerte impacto sobre la eficiencia de la técnica y sobre la calidad de los embriones obtenidos (Bermejo-Álvarez y col. 2010). Si tenemos presente que en la especie bovina únicamente entre el 30-40% de los ovocitos madurados *in vitro* evolucionan a blastocistos, mientras que en el caso de los madurados *in vivo*, y posteriormente sometidos a FIV y CIV, este porcentaje se sitúa en torno a un 60% (Rizos y col. 2002). Por lo tanto, resulta muy evidente que la maduración *in vitro* determina la capacidad para soportar el desarrollo embrionario.

Sin embargo, se ha prestado poca atención a los efectos de la MIV en la posterior competencia de los ovocitos. Así, los procedimientos de cultivo utilizados durante la maduración y la fecundación *in vitro* han sufrido muy pocas modificaciones durante las últimas décadas. En la mayor parte de los



laboratorios se continua empleando la técnica de maduración descrita por Fukui y Ono en 1989, consistente en cultivar durante 24 horas los ovocitos inmaduros en TCM-199, suplementado con un 10% de suero fetal, gonadotropinas (FSH y LH), y  $17\beta$ -estradiol, a una temperatura de  $38,5^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$  en aire.

Este medio, el TCM-199, fue diseñado en sus orígenes para satisfacer las necesidades de las células somáticas sometidas a prolongados periodos de cultivo. Sin embargo, este medio podría no ser el más idóneo para las necesidades complejas y dinámicas de los ovocitos durante el periodo de maduración. El fluido oviductal sintético (SOF) es uno de los medios más frecuentemente utilizados durante el cultivo in vitro de los embriones bovinos y por ello nos planteamos utilizarlo, también, durante el periodo de maduración, ello permitiría evitar los cambios bruscos y continuos en la concentraciones de iones, sustratos energéticos y en el pH y la osmolaridad. Algunos estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación (Ruibal y col, 2006) o por otros grupos (Oyamada y Fukui, 2004), han permitido demostrar que la utilización de SOF (suplementado con distintas sustancias) durante la maduración de los ovocitos bovinos permite obtener resultados comparables a los logrados con TCM-199.

Otra variable que parece influir de manera decisiva en los resultados es la composición de la atmósfera gaseosa. En condiciones fisiológicas, la tensión de oxígeno presente en el interior del tracto genital es considerablemente más baja que la presente en la atmósfera (Bishop, 1956; Fischer y Bavister, 1993; Mastroianni y Jones, 1965) y en el fluido folicular (22-97 mm Hg, correspondiente con un 3-15%, según McNatty (1978). Sin embargo, en la mayor parte de las ocasiones tanto la MIV como la FIV se llevan a cabo bajo la tensión de oxígeno atmosférica que es de un 20% (5% de  $\text{CO}_2$ ). Sin embargo, se ha comprobado que cuando se aplican unas concentraciones de oxígeno más bajas (entre 5-10%) durante el periodo de cultivo los resultados son mejores mientras que para la fase de maduración in vitro, en ausencia de co-cultivo, se ha establecido como óptima una concentración más baja de oxígeno (Tervit y col. 1972; Thompson y col. 1990; Yuan y col. 2003).

En los primeros estudios relacionados con las técnicas de producción in vitro de embriones indicaban que la MIV de ovocitos de ratón y hámster debía llevarse a cabo en bajas tensiones de oxígeno (5%) para lograr que se completara la maduración nuclear y la expulsión del primer corpúsculo polar (Haidri y col. 1971; Gwatkin y Haidri, 1974). Más recientemente se ha comprobado que la MIV en una baja tensión de oxígeno mejoraba los porcentajes de blastocistos producidos in vitro en los ratones (Banwel y col. 2007; Preis y col. 2007). Sin embargo, en otras especies la tensión de oxígeno más adecuada durante la MIV sigue siendo un asunto controvertido. Los trabajos realizados en la especie bovina han descrito la existencia de efectos beneficiosos (Hashimoto y col. 2000a,b) o perjudiciales (Pinyopummintr y Bavister, 1995; Watson y col. 2000; de Castro e Paula y Hansen, 2007). En el caso de la especie humana en unos laboratorios se utiliza una tensión de oxígeno ambiental (Cavilla y col. 2001; Heindryckx y col. 2007; Wei y col. 2008; Chian y col. 2009) y en otros una baja tensión de oxígeno (Son y col. 2005; Kanaya y col. 2006; Hashimoto y col. 2007). Probablemente las diferencias en los medios de maduración empleados, y particularmente en la concentración de glucosa, podrían explicar las divergencias observadas entre los diferentes estudios (Hashimoto y col. 2000 a,b; Oyamada y Fukui, 2004).

Otro de los factores ambientales identificado como responsable de la baja eficiencia de la técnica en relación con el porcentaje de blastocistos obtenidos in vitro y de la baja calidad de los mismos es el estrés oxidativo. Así, la exposición a la luz natural o artificial, unida a la mayor concentración de oxígeno durante el cultivo pueden inducir cambios en el metabolismo, desencadenando un desequilibrio entre la producción y eliminación de sustancias oxígeno reactivas (ROS) (Kitagawa y col. 2004; Dalvit y col. 2005). Estas diferencias con respecto a las condiciones fisiológicas pueden causar estrés oxidativo y alterar importantes funciones celulares incluyendo el control de la expresión de diversos genes (Moustassim y col. 1999), lo que podría comprometer los resultados obtenidos y la calidad de los embriones.

Para proteger del estrés oxidativo a los ovocitos y embriones durante el periodo de cultivo in vitro se han utilizado numerosos antioxidantes incorporados al medio de cultivo (Ali y col. 2003). Pero el mantenimiento del

equilibrio entre antioxidante y prooxidantes en los embriones mediante estos suplementos es un proceso complejo (Guerin y col. 2001). Debemos recordar que durante el desarrollo embrionario temprano se producen rápidos cambios en la fisiología y metabolismo del embrión (Gardner y Lane, 2003). Los cigotos tienen una actividad metabólica muy baja y su consumo de oxígeno también lo es. Tras la formación del blastocelo, el metabolismo se incrementa de forma muy significativa (Leese, 1995; Harvey y col. 2002). Por lo tanto la producción de ROS por los embriones y su susceptibilidad a éstas varía con la etapa de desarrollo en la que se encuentran. Por lo tanto, la necesidad de añadir antioxidantes al medio de cultivo puede variar en función de la etapa de desarrollo en la que se encuentran los embriones.

Los experimentos en los que hemos utilizado atmósferas con un bajo contenido de oxígeno intentaban reproducir las condiciones presentes en el interior del útero y el oviducto y mantenerlas durante las tres etapas del proceso, maduración, fecundación y cultivo. Para ello hemos empleado una atmósfera gaseosa compuesta por un 6% de O<sub>2</sub>, un 5% de CO<sub>2</sub> y un 89% de N<sub>2</sub>, a una máxima humedad relativa. Este protocolo fue diseñado basándonos en experiencias anteriores en las que los mejores resultados se logran cuando la tensión de oxígeno era reducida (Keskintepe y Brackett, 1996). La mejoría en los resultados obtenidos fue atribuida a la disminución en la formación de radicales libres que afectan al metabolismo embrionario y a su capacidad de desarrollo (Lane, 2001). Además, se ha comprobado que la elevada tensión de oxígeno provocaba un incremento del porcentaje de apoptosis (Yuan y col. 2003) y alteraba los patrones de expresión génica (Harvey y col. 2004).

Un tercer factor a tener en cuenta son los efectos de la presencia de sustancias de origen biológico en los medios de cultivo. Las sustancias más comúnmente utilizadas, el suero fetal, la albúmina bovina y hormonas de origen animal (FHS, LH, etc), varían notablemente en cuanto a su composición. Esta variabilidad puede ejercer sobre el desarrollo embrionario efectos altamente estimulantes o fuertemente inhibitorios (McKiernan y Bavister, 1992; Ali y Sirard, 2002; Lim y col. 2003). Además, el origen de estas sustancias incrementa el riesgo de que estén contaminadas con virus o priones, que pueden provocar alteraciones durante el desarrollo embrionario o fetal (Sagirkaya y col. 2007).

Ocaña-Quero y col. (1999) observaron un elevado porcentaje de ovocitos bovinos diploides, cuando estos fueron madurados en presencia de elevadas concentraciones (50%) de suero de vaca en celo (ECS) en el medio.

Nuestro objetivo general fue desarrollar un medio de maduración de composición definida sobre la base de utilizar un medio de cultivo simple, el fluido oviductal sintético (SOF), y en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%), condiciones utilizadas también durante el cultivo. Ello permitiría reducir los continuos cambios en la concentración de iones, sustratos energéticos, pH, osmolaridad y atmósfera gaseosa en las distintas etapas del proceso de producción de embriones in vitro.

En el primero de nuestros experimentos se ha evaluado la posibilidad de substituir las fuentes tradicionales de proteína (FCS Y BSA) por una macromolécula sintética (PVP-40). Nuestros resultados demostraron la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la tasa de división y en el número de blastocistos obtenidos entre los tres tratamientos considerados. Estos resultados difieren de los obtenidos anteriormente por Mingoti y col (2009), los cuales, trabajando en bajas tensiones de oxígeno, obtuvieron unas tasas de producción de embriones inferiores a la nuestras (24.5, 17.8 y 11.6% para FCS, PVP y BSA). Además señalaban la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos, siendo el grupo suplementado con FCS el que presentaba unos mayores porcentajes de blastocistos. Pensamos que las diferencias encontradas con nuestros resultados podrían ser atribuidas a que el medio de cultivo utilizado es diferente (TCM-199) del empleado por nosotros (SOF). En un estudio realizado Lonergan y col. (1994), comprobaron que la adición de suero al medio de maduración producía un efecto mucho más favorable cuando este era TCM-199, que cuando era SOF. Del mismo modo, Ali y Sirard (2002) indicaron que el efecto del FCS como suplemento proteínico durante la MIV depende del medio de cultivo usado y, justifica la necesidad de evaluar la macromolécula también en función del medio base empleado.

Las tasas de división y producción de blastocistos del grupo de BSA son similares a los obtenidos en ensayos previos (68.83% y 21.98% respectivamente,

de Orsi y Leese, 2004). También se ha establecido que el uso de BSA como única fuente de proteína durante la MIV de ovocitos bovinos retardaban la maduración nuclear y disminuía su capacidad de desarrollo, en cuanto a la producción de mórulas y blastocistos se refiere (Ali y Sirard, 2002).

En los mamíferos, el desarrollo embrionario más allá de la etapa de blastocisto supone la eclosión del embrión fuera de la zona pelúcida. Esta eclosión es un requisito necesario para que se pueda producir la implantación y la posterior gestación, y puede ser empleado como criterio para evaluar la viabilidad embrionaria (Lee y col. 1997). En este punto se han encontrado diferencias significativas entre los grupos con unas tasas de eclosión más elevadas (FCS y PVP-40) y el grupo de BSA. Sin embargo las tasas de eclosión entre el FCS y el PVP-40 no arrojaron diferencias estadísticamente significativas, en contraste a los datos publicados por Camous y col. (1984), que asociaron el empleo de medios definidos con un bloqueo en el desarrollo embrionario.

El número de células que constituyen el embrión es un factor condicionante de su competencia y dicho número no depende únicamente del medio utilizado durante el cultivo, sino que está condicionado también por la maduración de los ovocitos (Block y col. 2010). Estas diferencias han sido apreciadas también por Sagirkaya y col. (2007), ya que madurando los ovocitos con tres suplementos diferentes, encontraron diferencias significativas en el número de células por blastocisto aún cuando las condiciones de cultivo fueron las mismas en todos los casos. En este punto no se han hallado diferencias significativas al comparar los resultados obtenidos con PVP-40 y FCS. Por lo tanto podemos concluir, coincidiendo con lo apuntado por Chung y col. (2007), que es posible sustituir de las fuentes de proteína tradicionalmente empleadas durante la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos por una macromolécula sintética (PVP-40) manteniendo unas tasas de desarrollo embrionario muy aceptables.

Sin embargo, debemos ser conscientes, tanto para éste como para los posteriores ensayos, que el valor predictivo del porcentaje de blastocistos para conocer la competencia de los ovocitos para soportar el desarrollo es relativo, ya que las alteraciones inducidas durante esta etapa pueden afectar al

metabolismo celular o modificar la expresión de algunos genes, y estos efectos se manifestarán durante el desarrollo postimplantacional, neonatal e incluso durante la vida adulta (Duranton y Renard, 2001; Lane y Gardner, 2003). Por lo tanto sería necesario realizar otros ensayos para determinar las tasas de apoptosis celular y la supervivencia embrionaria. Además es necesario evaluar los porcentajes de gestación logrados tras la transferencia de estos embriones a hembras receptoras y posibles alteraciones durante el desarrollo fetal asociadas a las modificaciones del medio de maduración.

En un segundo experimento se ha evaluado el impacto del sustrato energético empleado en la MIV a bajas concentraciones de oxígeno y en ausencia de suplementos proteicos. El sustrato energético más adecuado para para la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario y la concentración del mismo puede diferir en función de la tensión de oxígeno. La presencia en el medio de maduración de sustratos energéticos inapropiados podría inducir alteraciones en el metabolismo de los ovocitos y de los embriones, una reducción de la capacidad de desarrollo y de la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, tal y como demostraron Rose-Hellekant y col. (1998).

En la primera parte de este experimento, se ha evaluado la dinámica de maduración nuclear de los ovocitos cultivados en diferentes concentraciones de glucosa en comparación con un grupo control, encontrándose por un lado, unos patrones de cinética nuclear de MIV similares a los descritos anteriormente por otros autores en la especie bovina (Sirard y col. 1989; De Loos y col. 1994) y por otro, la influencia de la composición del medio de maduración sobre esta cinética, tal y como ha sido previamente demostrado (Lonergan y col. 1997).

Hay diversos factores relacionados con la evolución nuclear durante la maduración que influyen de una manera marcada sobre la competencia de los ovocitos para soportar el desarrollo embrionario. Estos factores son la velocidad de progresión de la maduración nuclear, el tiempo necesario hasta que se completa la expulsión del primer corpúsculo polar (PB) y el periodo que transcurre entre el momento en el que se completa la metafase II y la fecundación (Dominko y First, 1997, Krisher y Bavister, 1999, Balakier y col. 2004). Así, Dominko y First (1992) demostraron que los ovocitos que

expulsaban el primer corpúsculo polar más rápido durante la maduración tenían mayor posibilidad de desarrollarse hasta blastocistos. De manera similar, Van der Wenterlaken y col. (1992) observaron que los ovocitos que habían expelido el corpúsculo polar entre las 16 a 20 horas de cultivo mostraban unas mayores tasas de mórulas/blastocistos que aquellos en los que se retrasaba la expulsión del mencionado corpúsculo. Estas observaciones indican que la cinética de maduración nuclear podría ser un buen indicador de que los ovocitos adquieren la competencia para soportar el desarrollo, y tal y como ha sido indicado anteriormente (Iwata y col. 2004), y como hemos podido comprobar a través de nuestros propios experimentos, en los que se observa que los mayores porcentajes de blastocistos aparecían en los grupos en los que la maduración nuclear evolucionaba con mayor rapidez hacia etapas más avanzadas y en los que aparecían los mayores porcentajes de ovocitos en MII al concluir el período de maduración.

El incremento del metabolismo de la glucosa a través de una o más rutas metabólicas se produce en el caso de los ovocitos bovinos a medida que la meiosis progresa hacia la metafase II (Steeves y Gardner, 1999a), y la elevación del metabolismo de la glucosa observada en los ovocitos maduros está correlacionado con una mayor competencia para soportar el desarrollo de los embriones bovinos (Krisher y Baviser, 1999). Por lo tanto, la incorporación de glucosa en el medio de maduración acelera la progresión de la maduración nuclear de los ovocitos bovinos. Esta hipótesis ha sido confirmada en nuestro ensayo, ya que cuando los ovocitos maduraban en una atmósfera con un 6% O<sub>2</sub>, las mayores proporciones de ovocitos en fases más retrasadas de la maduración nuclear a las 6 y 12 horas fueron observadas en los grupos madurados con concentraciones de glucosa más bajas. Además, al concluir el período de maduración, el porcentaje de ovocitos que habían alcanzado la metafase II era mayor en los medios que contenían mayores concentraciones de glucosa ( $p < 0,05$ ). De igual forma, el porcentaje de blastocistos totales aumentaba en la misma medida que lo hacía la concentración de glucosa en el medio de maduración.

Sin embargo, cuando se tienen en cuenta los resultados del grupo control, madurado en una atmósfera con un 20 % de O<sub>2</sub> y una concentración

de glucosa 5,6 mM, el porcentaje de ovocitos en metafase II al concluir el periodo de maduración es notablemente superior al obtenido utilizando esa misma concentración de glucosa en una atmósfera con bajos niveles de oxígeno, y para logra valores similares en estas condiciones de atmósfera gaseosa es necesario utilizar una concentración de glucosa 10 mM. Por lo tanto, los efectos de la concentración de glucosa dependen en gran medida de la presión parcial de oxígeno en la atmósfera utilizada durante el periodo de maduración. Para poder comprender como se produce esta interacción hay que tener presente que cuanto mayor es la concentración de oxígeno habrá mayor disponibilidad del mismo para el ovocito y para las células del cúmulo, y que la maduración nuclear depende de la disponibilidad de oxígeno (por revisión Cetica y col, 2003). Así, cuando los CCO se cultivaron en una atmósfera con una elevada concentración de oxígeno, la cantidad de oxígeno disponible en las células situadas en el centro del cúmulo era un 30% inferior al disponible en las células situadas en la periferia (Gassmann y col, 1996). Por lo tanto, en los ovocitos rodeados por un gran número de capas de células del cúmulo el oxígeno podría resultar un factor limitante de su evolución cuando la atmósfera contiene bajas cantidades de O<sub>2</sub> (6%) ya que es muy probable que las células del cumulo que se encuentran en estrecho contacto con el ovocito experimenten un marcado déficit en cuanto a la disponibilidad de oxígeno. La hipoxia ejerce un efecto inhibitorio sobre el metabolismo aeróbico, provocando un desplazamiento en la producción de ATP desde el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria mitocondrial hacia la glucólisis anaeróbica (Czyzyk-Krzeska, 1997; Wengner y Gassman, 1997).

Este cambio en la forma de metabolizar la glucosa cuando la tensión de oxígeno es baja viene respaldado por otros experimentos previos. Así, Semeza y col (1992) describió la existencia de un factor denominado Factor inducido por la hipoxia I (HIF I), que induce la secreción de eritropoyetina en condiciones de bajas tensiones de oxígeno en humanos, y que sus zonas de unión están implicados en la regulación de una serie de genes que se activan por la hipoxia. Dentro de esta categoría de genes están incluidos los que codifican algunas enzimas glucolíticas (Firth y col, 1994, 1995; Semenza y col, 1994) y transportadores de glucosa (Bashan y col, 1992; Ebert y col, 1995). En un



ensayo reciente realizado por Bermejo-Álvarez y col. (2010), en el que se analizaron 4 genes relacionados con el metabolismo: el GLUT1 (un transportador de la glucosa), la GADPH y la LDHA (dos enzimas involucrados en la glucólisis anaeróbica), y la G6PD (enzima que metaboliza el paso inicial e irreversible de la ruta de las pentosas fosfato). En dicho ensayo encontraron las concentraciones de poli(A)mRNA de la GLUT1 y de los dos enzimas involucrados en la glucólisis anaeróbica en las células del cúmulo de los CCO madurados en bajas concentraciones de oxígeno eran mayores que las observadas en los madurados en concentraciones similares a la atmosférica. Estos datos indican la existencia de una mayor entrada de glucosa y un incremento de la glucólisis anaerobia. Sin embargo, al analizar la expresión génica en los ovocitos, únicamente encontraron diferencias en las concentraciones de GADPH, lo que probablemente sea debido a que los ovocitos bovinos apenas metabolizan la glucosa (Rieger y Loskutoff, 1994), situación similar a la observada en otras muchas especies, entre las que se encuentran la rata, el mono, los humanos y los ratones (Sirard y col, 1998). Los ovocitos de los mamíferos desprovistos de células del cúmulo tienen una capacidad muy relativa para metabolizar piruvato y son incapaces de metabolizar la glucosa.

Durante la maduración de los ovocitos la mayor parte del ATP presente en el interior del ovocito procede de la glucólisis o de la actividad de las células de la granulosa (Trimarchi y col, 2000). El ATP producido en las células del cúmulo a partir de la glucosa puede atravesar las uniones GAP existente entre las células del cúmulo y los ovocitos (Eppig, 1991). La hidrólisis del ATP es necesaria para soportar una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la actividad de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa, síntesis de proteínas y macromoléculas, control del pH, transporte de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos. Particularmente es posible que la hidrólisis del ATP sea necesaria para la fosforilización de "mitogen-activated protein (MAP) kinase" la cual se supone que está involucrada en la organización de los microtúbulos y la cromatina durante la transición entre las dos metafases meióticas (Verlhac y col 1994). Además, se ha demostrado que la ruta de las Mos/.../MAP kinasa es necesaria para el mantenimiento de los microtúbulos y de la cromatina durante la etapa

de la metafase de la división meiótica (Verlhac y col, 1996). El contenido de ATP en los ovocitos al final de la maduración (Van Blerkom y col, 1995) y de los embriones durante su desarrollo preimplantacional (Quinn y Wale, 1973; Slotte et al., 1990) es un indicador de su viabilidad. Los resultados obtenidos por Hashimoto y col. (2000a) sugieren que la concentración de ATP en los ovocitos condiciona su capacidad para completar la maduración meiótica y que es necesaria una cantidad mínima de ATP para que los ovocitos sean capaces de completar la maduración meiótica, independientemente de la tensión de oxígeno en la que se produce. El ATP se produce a partir de respiración mitocondrial bajo condiciones aeróbicas o a través de glicolisis en condiciones anaeróbicas.

Por lo tanto, la mayor parte del consumo de oxígeno que tiene lugar durante la maduración in vitro de CCO se atribuye a las células del cúmulo (revisado por Harvey, 2007). En un estudio realizado por Hashimoto y col (2000b) con el objetivo de determinar la influencia de la concentración de glucosa durante la maduración meiótica de los ovocitos bovinos en atmósferas con bajo contenido de oxígeno, evaluaron los efectos de los metabolitos de la glucosa y de un inhibidor de la glucolisis durante la maduración meiótica y observaron que la proporción de ovocitos en MII y de la concentración intracelular de ATP descendían cuando los CCO maduraban en presencia de un inhibidor de la glucolisis. Además, los metabolitos de la glucosa como el piruvato y lactato, que son necesarios para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos no mejoraron la maduración meiótica, ni incrementaban la concentración de ATP en bajas tensiones de oxígeno. Además, a pesar de que el piruvato ha sido considerado el principal sustrato energético cuando los ovocitos son madurados en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub> en aire (Bigers y col, 1967) y como único sustrato energético capaz de soportar la maduración meiótica de los ovocitos de ratón bajo un 20% de O<sub>2</sub>. Esta situación es consecuencia de que cuando la tensión de oxígeno es reducida el sustrato crítico para la maduración de los CCO bovinos es la glucosa en lugar del piruvato (Hashimoto y col, 2000b). Por ello, cuando comparamos los resultados obtenidos al madurar los ovocitos con una concentración de glucosa 5.6 mM frente a los logrados con concentraciones más elevadas, la proporción de los ovocitos que alcanzan la

metafase II es menor, y por tanto se comprueba que los mecanismos que intervienen en la regulación de la maduración meiótica son diferentes en los CCO cultivados en altas y bajas concentraciones de oxígeno.

Pinyopummintr y Bavister (1995) observaron que en los ovocitos madurados en TCM-199, con un contenido en glucosa 5.56 mM, el porcentaje de ovocitos que alcanzaban la metafase II era sensiblemente inferior cuando la concentración de O<sub>2</sub> es del 5 o 10% que en los madurados en una atmósfera del 20%. De la misma manera De Castro e Paula y Hansen (2007) observaron que cuando utilizaban como medio de maduración TCM 199, la adición de glucosa hasta alcanzar una concentración 20 mM no permitía superar los efectos negativos de la maduración en bajos niveles de oxígeno, fenómeno que si que se producía cuando los ovocitos eran madurados en mSOF. Por lo tanto el efecto del oxígeno y su modulación por la concentración de glucosa estaba condicionado por el medio base mSOF o mTCM-199. La combinación de TCM 199 y una baja tensión de oxígeno parece incapaz de soportar la maduración de los ovocitos bovinos in vitro y la producción de energía por los CCO's (Hasimoto y col., 2000a). Esta situación ha sido atribuida la mayor producción de sustancias oxígeno reactivas en los ovocitos madurados con mTCM-199 que en los madurados con mSOF. Esta situación provocaría que los efectos beneficiosos sobre la síntesis de ATP logrados cuando se aumenta la concentración de glucosa en bajos niveles de oxígeno, serían contrarrestados por los efectos negativos de los radicales libres sobre el metabolismo (De Castro e Paula y Hansen, 2007).

Se ha comprobado la existencia de una relación entre: el medio de cultivo base, el substrato energético, la atmósfera gaseosa y el estado redox de los ovocitos. Es probable que el incremento de la concentración de glucosa en el medio de maduración en presencia de elevados niveles de oxígeno, favorezca la formación de radicales libres (Iwata y col 1998; Oyamada y Fukui, 2004) y la disminución de los niveles intracelulares de glutatión en el ovocito (Hashimoto y col 2000b). De hecho, cuando la atmósfera tiene un elevado contenido en oxígeno las elevadas concentraciones de glucosa resultan perjudiciales para la maduración de los ovocitos. Una de las principales vías de generación de ROS es el catabolismo de la hipoxantina, el efecto inhibitor de la glucosa sobre la

enzima hipoxantina-fosforribosiltransferasa (HPRT) (Downs y Dow, 1991), responsable del rescate de los nucleótidos, produciría el aumento del catabolismo de la hipoxantina y consecuentemente de la producción de  $H_2O_2$ , provocando daño celular. Adicionalmente, la glucosa es capaz de generar radicales libres a través de procesos de autooxidación (Hunt y col 1988).

Todo ello demuestra, como se viene reiterando, que la concentración óptima de los diferentes substratos energéticos presentes en el medio de maduración, está condicionada por la atmósfera gaseosa utilizada, pudiendo variar notable de manera en función de la concentración de oxígeno (Hashimoto y col 2000a, b; Oyamada y Fukui, 2004). Así, la asociación de altas concentraciones de glucosa con altas tensiones de  $O_2$ , favorecen la producción de ROS en el interior del ovocito y comprometen su competencia para soportar el desarrollo embrionario (Hashimoto y col 2000a, b). Por el contrario, cuando el incremento de la concentración de glucosa tiene lugar en una atmósfera con una baja tensión de  $O_2$ , aumenta el porcentaje de ovocitos que adquieren competencia, bien como consecuencia de que éstos tienen una mayor capacidad para producir energía (Bermejo-Álvarez y col 2010) o por una reducción en la generación de ROS, y por ello repercute de manera favorable en la producción de blastocistos (Hashimoto y col 2000a; Oyamada y Fukui, 2004).

También se ha considerado la posibilidad de que el efecto negativo provocado por el incremento de la concentración de glucosa en condiciones aeróbicas sea debido, en parte, al aumento en la osmolaridad del medio. Así, se han encontrado evidencias de que una disminución de la osmolaridad del medio de maduración desde 373 a 215 mOsM, incrementaba las tasas de formación de los pronúcleos masculinos y la monoespermia, así como el contenido de glutatión en los ovocitos porcinos (Funahashi y col 1994). Por lo tanto, el descenso en la capacidad para soportar el desarrollo de los ovocitos bovinos madurados en presencia de altas concentraciones de glucosa podría ser consecuencia del incremento de la osmolaridad en el medio de maduración. Sin embargo, nuestros resultados no establecen ninguna diferencia en el porcentaje de blastocistos obtenidos en el grupo control madurado con una concentración de glucosa 5.6 mM en aerobiosis y los del grupo madurado con

una concentración de glucosa 10 mM y en bajos niveles de oxígeno. Por lo tanto no nos parece probable que el incremento de la osmolaridad del medio de maduración provoque una disminución en la capacidad de los ovocitos para soportar el desarrollo embrionario.

Se ha demostrado recientemente que el reinicio de la meiosis en ovocitos murinos en fase de parada meiótica, inducida por hipoxantina o dibutiril-AMP cíclico, estaba regulado por el metabolismo de la glucosa a través de la ruta de las pentosas fosfato (Downs, 1997; Downs y col, 1998). Considerando esos datos, los efectos beneficiosos de las elevadas concentraciones de glucosa cuando la maduración meiótica se produce en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno, podrían no ser debidas exclusivamente a la producción de ATP por la vía de la glucólisis anaerobia, sino que intervendría también la vía de las pentosas fosfato. Por ello, consideramos que son necesarios nuevos experimentos para poder comprender como interviene la glucosa para promover la maduración meiótica en ovocitos bovinos en anaerobiosis.

Además, hemos comprobado a través de la segunda parte de nuestro experimento, que las diferencias en la cinética de maduración nuclear determinan diferencias en las tasas de producción de blastocistos durante el cultivo posterior.

Lo anteriormente expuesto indica que las rutas metabólicas utilizadas durante la maduración de los ovocitos para la producción de energía son diferentes en función de la concentración de oxígeno presente en la atmósfera gaseosa. Tanto la cinética de maduración nuclear, como los porcentajes de blastocistos producidos empleando atmósferas gaseosas con bajo contenido en oxígeno pueden ser similares a las alcanzadas en condiciones de aerobiosis cuando se emplea la concentración de glucosa adecuada. Así, nuestros resultados nos permiten concluir, que la efectividad de un sistema de maduración in vitro para soportar la maduración ovocitaria en un medio libre de proteínas y con baja tensión de oxígeno (6%) depende de la concentración de glucosa, y que solamente cuando los ovocitos maduran en un medio con una concentración 10 mM de glucosa podemos obtener porcentajes de

ovocitos en metafase II al final del periodo de maduración, similares a los del grupo control.

El objetivo del tercer experimento era evaluar la posibilidad de substituir las gonadotrofinas de origen natural (LH, FSH), empleadas de manera habitual durante la maduración *in vitro*, por otras sustancias. Para ello, nos planteamos utilizar el Factor de crecimiento epidérmico (EGF), dado que se ha demostrado en numerosas especies su capacidad de estimular la maduración nuclear: en rata (Dekel y Sherizly, 1985), ratón (Das y col, 1991; Downs, 1989), porcino (Coskun y Lin, 1994; Ding y Foxcroft, 1994; Wang y Nina, 1995) y en la especie humana (Das y col, 1991). También se ha comprobado que en la especie bovina el EGF induce la maduración de los ovocitos y la expansión de las células del cúmulo, y favorece la capacidad de los ovocitos para soportar el desarrollo embrionario (Harper y Brackett, 1993; Lonergan y col, 1996; Rieger y col, 1998), e, incluso, permiten que los ovocitos maduren sin necesidad de añadir al medio de cultivo gonadotrofinas o FCS (Farin y col, 2007). De la misma manera, se ha comprobado que la incorporación al medio de otros factores de crecimiento similares al EGF, como la anfiregulina, epiregulina y betacelulina, también favorece la maduración ovocitaria de los CCO's de ratón (Park y col, 2004) y de rata (Ashkenazi y col, 2005). Se ha comprobado que el EGF altera el patrón de las proteínas sintetizadas durante la maduración *in vitro* en los ovocitos bovinos y que acelera la meiosis en estos mismos ovocitos. Estas acciones sondebidas, probablemente, al incremento de la actividad de las histonas y la actividad mitogénica de las proteína-kinasas (MAP quinasas) durante las primeras etapas de la MIV (Lafleur y col, 1994).

Sin embargo, no hemos encontrado diferencias entre los resultados obtenidos al utilizar el medio suplementado con EGF y el medio control en los porcentajes de cigotos divididos a las 48 horas, el porcentaje de blastocistos y la tasa de eclosión de estos últimos. Sin embargo, el porcentaje de blastocistos fue significativamente más elevado cuando la maduración tiene lugar en un medio suplementado con hormonas.

Una de las posibles razones por las que la utilización de EGF durante la maduración *in vitro* no produce efectos favorables, es que sea necesario que el

EGF deba actuar de forma concomitante con las gonadotrofinas, en contra de lo expresado previamente por Farin y col (2007). Así, para que se complete en los ovocitos la maduración citoplasmática y nuclear es necesario que se produzca una interacción compleja entre gonadotrofinas, esteroides y señales foliculares (Moor y col, 1981; Osborn y Moor, 1983; Thibault y col, 1987). Además se ha demostrado que el mecanismo de acción de los factores de crecimiento se basa en su unión a unos receptores por los que tiene una alta afinidad, lo que determina la generación de señales y segundos mensajeros en la membrana y el citoplasma (Druker y col, 1989; Hill, 1989). La cantidad de receptores para la EGF (EGFr) presentes en los tejidos diana está condicionada por la actuación previa de las gonadotrofinas y los esteroides. Así, la administración de FSH o hCG a roedores provocó un incremento en el número de EGFr (St-Arnaud y col, 1983), mientras que la prolactina, la progesterona y el estradiol no mostraron ningún efecto. De la misma manera, el cultivo in vitro de células de la granulosa de rata en presencia de FSH (2.5-5 ng/ml) provoca unos niveles de EGFr, siendo entre 2 y 3 veces superiores a los encontrados en el grupo control (Feng y col, 1987). En ese mismo estudio se comprobó que se producía un descenso en el número de EGFr cuando se añadía LH o hCG. Además, la incorporación de EGF puede atenuar el incremento del número de receptores para LH inducido por la FSH tanto en ratas, como en cerdos (Knecht y Catt, 1983; May y Schomberg, 1989). La interacción existente entre el EGF y las gonadotropinas FSH y LH, con respecto a la regulación del número de receptores, juega un importante papel en la acción del EGF durante la maduración ovocitaria. Esto concuerda con los hallazgos de Bolamba y col (2006), Harper y Brackett (1993) y De La Fuente y col (1999), ya que todos ellos comprobaron que los efectos del EGF eran mucho más manifiestos cuando se incorporaba al medio de maduración junto con gonadotrofinas. Otro indicio más fue obtenido por Park y Lin (1993), quienes al evaluar el efecto de la sustitución del FCS por EGF más BSA empleando un medio definido y una concentración de oxígeno del 5% no hallaron diferencias en las tasas de división, mientras al emplear un medio de maduración definido suplementado con FSH y BSA, sí que observaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los que contenían EGF o estaban libres de este factor. Además, los porcentajes de divididos en el grupo madurado en presencia

FSH+EGF eran los más elevados de los cuatro grupos considerados. Park y col (2004) llegaron a la conclusión de que los factores de crecimiento relacionados con el EGF ejercen una actividad paracrina propagando la señal de la LH a través del folículo, ya que observaron que la estimulación con LH inducía la expresión, de manera transitoria y secuencial, de numerosos miembros de la familia del EGF, anteriormente citados: amfiregulina, epiregulina y betacelulina. Del mismo modo, Bolamba y col (2006), trabajando con ovocitos caninos, concluyen que la interacción entre el EGF y las gonadotrofinas tiende a incrementar la proporción de ovocitos que reanudan la meiosis y completan la maduración nuclear.

Algunos trabajos han señalado que el EGF puede actuar como una fuente de proteínas, especialmente cuando se utilizan medios simples libres de proteínas, como el empleado en nuestros experimentos, provocando cambios en el metabolismo y el desarrollo. Sin embargo, en un estudio realizado por Wood y Kaye (1989), la adición de al medio de maduración de una cantidad equimolar de BSA no producía los mismos efectos en la síntesis de proteínas que los logrados al incorporar el EGF. Además, Buyalos y Cai (1994) demostraron que los efectos positivos del EGF sobre el desarrollo embrionario eran debidos exclusivamente a sus efectos mitogénicos. Así, mediante el uso de anticuerpos anti-EGF, evidenciaron que los efectos de EGF son causados por su unión a los receptores y no por sus efectos nutritivos (Lonergan y col, 1996).

Otro factor a tener en cuenta en el momento de analizar los resultados, es su posible interacción con la composición del medio base, ya que se han demostrado la existencia de diferencias estadísticamente significativas en las tasas de división y de desarrollo hasta blastocistos asociadas a los diferentes medios de cultivo usados durante la MIV (Rose y Bavister, 1992). Así Lonergan y col (1994) comprobaron que el efecto del FCS sobre la maduración ovocitaria y el posterior desarrollo embrionario era significativamente mayor cuando se incorporaba al TCM-199 que cuando se hacía al SOF. De la misma manera, Park y Lin (1991), empleando dos medios de maduración definidos distintos (PL<sub>2</sub> y PL<sub>3</sub>) y una atmósfera con bajo contenido en oxígeno, comprobaron que la adición del EGF únicamente provocaba diferencias significativas cuando se añadía a uno de los medios. Por ello, consideramos que sería muy interesante



evaluar los efectos de la incorporación de EGF al medio base más usado durante la maduración (TCM-199), bajo condiciones de 6% de O<sub>2</sub> y en ausencia de suplementación proteica.

Otro de los posibles factores de variación es la concentración de oxígeno en la atmósfera gaseosa empleada, ya que como se comprobó en el experimento anterior, los cambios en la concentración de oxígeno determinan un cambio sustancial en las rutas metabólicas empleadas, lo cual podría repercutir sobre la ruta empleada por el EGF. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis serían necesarios nuevos experimentos.

También se ha señalado que la concentración de EGF presente en el medio de maduración produce grandes variaciones en los resultados. Así, algunos trabajos que recomiendan utilizar concentraciones de EGF muy bajas (50 ng/ml; Lorenzo y col, 1994). Además, si nos basamos en las concentraciones presentes en el fluido folicular en la especie porcina (13.6 ng/ml) (Hsu y col, 1987) y la humana (de 0.60 a 31.3 ng/ml) (Chabot y col, 1986; Westergaard y Andersen, 1991), se podría sospechar que una elevada concentración de esta sustancias podría tener un efecto nocivo. Sin embargo, existen algunos estudios en los que se consiguen efectos positivos empleando concentraciones de EGF de 1000 ng/ml (Hosoda y Terada, 2007).

El efecto favorable de la adición de EGF al medio de maduración sobre la expansión de las células del cúmulo en los CCO madurados *in vitro*, que hemos comprobado en nuestros experimentos, ha sido descrito previamente por otros autores (Downs 1989; Harper y Brackett 1993; Singh y col, 1993; Kobayashi y col, 1994; Lorenzo y col, 1994; Lonergan y col,). Sin embargo, el efecto que tiene la expansión de las células del cúmulo sobre la posterior competencia de los ovocitos bovinos es controvertida. Algunos autores sostienen que la expansión de las células del cúmulo en los CCO es decisiva para lograr la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos inmaduros (Yoshida y col, 1992; Chen y col, 1993; Romero- Arredondo y Seidel 1996), ya que los mayores porcentajes de blastocistos fueron obtenidos cuando las células del cúmulo sufrían una buena expansión. Sin embargo, existen también numerosos artículos que indican que la expansión del cúmulo no es necesaria para que se

produzca la fecundación y el posterior desarrollo hasta blastocisto (Zuelke y Brackett, 1990; Choi y col, 2001; Lonergan y col, 1996; Paula-Lopes y col, 1998; Ali y Sirard, 2002). Nuestros resultados indican que el grado de expansión de las células del cúmulo no permite valorar de forma objetiva la competencia de los ovocitos para soportar la fecundación y el posterior desarrollo embrionario.

Los efectos positivos que ejerce el EGF durante la maduración nuclear del ovocito están mediados a través de los receptores específicos existentes en las células del cúmulo. Así, se ha comprobado tanto en ratones (Downs, 1989) como en bovinos (Lorenzo y col, 1994) que la presencia de EGF es incapaz de favorecer la maduración nuclear de los ovocitos cuando previamente se ha procedido a la eliminación de las células del cúmulo. Igualmente se ha demostrado que la producción de otros ligandos para los receptores de EGF (EGFr), incluyendo la ampiregulina y epiregulina, se estimula en los CCO's por la acción de LH, para lo que se requiere la presencia de un cúmulo intacto (Park y col, 2004).

Dado que el objetivo de nuestro ensayo era evaluar la posibilidad de prescindir de las hormonas de origen biológico empleadas tradicionalmente, substituyéndolas por EGF, los resultados obtenidos por nosotros no coinciden en su totalidad con los obtenidos anteriormente en trabajos realizados en ratones (Downs, 1989; Das y col, 1991) o en bovinos (Coskun y col, 1991). Nuestros resultados demuestran que cuando se emplea EGF solo, se produce un aumento en el grado de expansión de las células del cúmulo, pero no se incrementan los porcentajes de cigotos divididos a las 48 horas, ni los porcentajes de blastocistos.

Estos resultados nos hicieron decantarnos por evaluar los efectos de la incorporación de FSH recombinante humana (rh-FSH), de origen sintético, sobre la maduración in vitro de los ovocitos. Se ha comprobado que las gonadotrofinas humanas de origen recombinante son capaces de estimular la ovulación, la maduración y la esteroidogénesis en ratas (Galway y col, 1990; Törnell y col, 1995). Además, han sido muy utilizadas durante maduración in vitro de ovocitos de diferentes especies de roedores, determinando sus efectos durante el proceso (Törnell y col, 1995; Byskov y col, 1997; Cortvrindt y col,

1998). Nuestros resultados indican que la utilización de r-hFSH para la maduración in vitro de ovocitos bovinos, en un medio definido, libre de proteínas y con una atmósfera baja en oxígeno, permite obtener unos resultados en cuanto a tasas de división, porcentajes de blastocistos producidos y tasas de eclosión muy similares a los logrados al emplear el medio control que estaba suplementado con FSH, hCG y estradiol. Estos resultados fueron similares a los obtenidos previamente por otros autores utilizando ovocitos bovinos o humanos (Anderiesz y col, 2000b; Mikkelsen y col, 2000; Modina y col, 2000).

Debemos señalar que las diferencias entre el medio utilizado como control y el suplementado con r-hFSH, no solo radicaban en el origen de la FSH, sino que también eran consecuencia de la presencia en el primero de ellos de estradiol y hCG. Dado que no hemos encontrado diferencias entre el medio control y el suplementado con 1 UI/ml de r-hFSH, tenemos serias dudas del papel desempeñado por la hCG y el estradiol. Aunque algunos autores han demostrado que ni las gonadotrofinas (FSH/LH), ni los factores de crecimiento (EGF), son imprescindibles para la producción de embriones bovinos (Trounson y col, 1994), existen trabajos que demuestran que la proporción de ovocitos que evolucionan a mórulas y blastocistos es mayor cuando los ovocitos maduran en presencia de LH y/o FSH (Saeki y col, 1991; Zuelke y Brackett, 1993; Izadyar y col, 1998a, b). Además, se consideraba que la LH era la principal responsable de provocar el reinicio de la meiosis in vivo (Lindner y col, 1974), y diversos estudios señalaban que la incorporación de LH a los medios de maduración libres de suero favorecían la maduración meiótica, la fecundación y aumentan el porcentaje de blastocistos producidos a partir de ovocitos bovinos madurados in vitro (Younis y col, 1989; Zuelke y Brackett, 1990; Saeki y col, 1991; Martins y col, 1998). Sin embargo, en trabajos posteriores en los que se utilizaba rLH durante la maduración in vitro, se comprobó que la LH sola no ejercía ningún efecto beneficioso sobre la capacidad ovocitos bovinos para soportar desarrollo embrionario (Accordo y col, 2001; Anderiesz y col, 2000a; Choi y col, 2001; Ali y Sirard 2002). Estos autores señalan la posibilidad de que en los trabajos en los cuales se comprueba que la LH ejerce un efecto beneficioso, ello sea debido a la contaminación con FSH u otras sustancias de naturaleza desconocida, debido a que se obtiene mediante la purificación de extractos hipofisarios, lo que podría

condicionar los resultados (Zuelke y Brackett, 1990). Además, se ha demostrado que las células del cúmulo y de la granulosa de folículos de tamaño intermedio (2-8 mm de diámetro), únicamente expresan receptores para la FSH y no para la LH (Tol y col, 1996; Nuttinck y col, 2004), siendo éste es el tamaño medio de los folículos de los que obtenemos los ovocitos empleados en estos experimentos.

Los efectos de la presencia de estradiol en los medios de maduración siguen siendo objeto de cierta controversia. Así, algunos autores señalan que el estradiol inhibe la progresión de la meiosis en CCO y ovocitos desnudos (Richter y McGaughey, 1979; Eroglu 1993; McGaughey 1979). Sin embargo, otros autores describen que la adición de 1 microg/ml de estradiol al medio de maduración aumenta la tasa de maduración (Fukui y col, 1982; Younis y col, 1989) y que ejerce un efecto muy beneficioso durante el desarrollo embrionario posterior (Guler y col, 2000). Lo que si parece claramente demostrado es que el estradiol tiene la capacidad de interactuar con la FSH (para revisión ver Beker y col, 2002). En nuestros experimentos el grupo madurado en presencia de 1 UI/ml de r-hFSH no llevaba estradiol, sin que ello provocara un descenso en las tasas de división, en el porcentaje de blastocistos producidos, ni en el porcentaje de eclosionados. Nuestros resultados podrían explicarse en base a lo señalado previamente por Accardo y col (2004), quienes al evaluar diferentes combinaciones de estradiol, r-hFSH y pFSH, observaron un efecto sinérgico entre el estradiol y la r-hFSH, mientras que dicho efecto no aparecía cuando el estradiol se combinaba con la pFSH. Estos autores sugieren que el diferente efecto observado en relación con el origen de la FSH, podría deberse a las diferencias en el patrón de glicosilación o a la existencia de algún contaminante generado durante el proceso de preparación de la FSH purificada a partir de extractos hipofisarios, capaz de interactuar con el estradiol e influir en los resultados (Zuelke y Brackett, 1990; Choi y col, 2001).

Además, la ausencia de efectos atribuibles a la no incorporación de LH y estradiol, podría deberse también a la mayor pureza de la r-hFSH en comparación con la pFSH y a su mayor capacidad para estimular la maduración *in vitro*. Esta mayor capacidad estimuladora ha sido comprobada en trabajos previos (Alberio y Palma, 1998; Izadyar y col, 1998a; Anderiesz y col, 2000b) en los que se ha podido comprobar su efectividad para estimular la maduración in

vitro en diferentes especies a concentraciones muy bajas (0.01-1 UI/ml (1-100 ng/ml)), independientemente de que se utilice sola o combinada con estradiol (Izadyar y col, 1998a,b; Ali y Sirard, 2002b). Se ha sugerido que la r-hFSH contiene una mayor cantidad de isoformas básicas con mayor actividad biológica sobre los receptores de FSH y una mayor resistencia a la degradación (4% vs. 40%) pudiendo ser las responsables de su mayor efectividad (Calder y col, 2003). Esta relación entre las isoformas que conforman la FSH y su actividad sobre los receptores de FSH ha sido descrita previamente y ello ha permitido establecer una correlación positiva entre el contenido en ácido siálico en cada una de las isoformas y su actividad biológica tanto in vitro como in vivo (Stanton y col, 1996). Existen otros aspectos que ponen de manifiesto la mayor actividad biológica de la FSH de origen recombinante, como por ejemplo las bajas dosis necesarias para inducir la expansión del cúmulo en un medio libre de suero (1 ng/ml) (Calder y col, 2003) y su efectividad para inducir ovulaciones múltiples en la especie humana (Schats y col, 2000).

Sin embargo, al evaluar los efectos de diferentes concentraciones de r-hFSH nuestros resultados son bastante contradictorios, ya que se comprueba la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que contiene 0.5 UI/ml de r-hFSH con el resto de los grupos, observándose los valores más bajos en cuanto a las tasas de división y los porcentajes de blastocistos obtenidos, mientras que en el grupo de concentración de 0.01 UI/ml mostraron valores intermedios y no presentaban diferencias estadísticamente significativas con los grupos control y el de 1 UI/ml.

Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con los de Accardo y col (2004), e indican que bajo las condiciones establecidas en nuestro ensayo la r-hFSH puede estimular la progresión del ciclo meótico en ausencia de estradiol y LH, si bien son necesarios nuevos experimentos para evaluar el efecto de la concentración y poder determinar con claridad los mecanismos de acción de dicha molécula.

En el siguiente experimento se evaluó el efecto de la duración del periodo de maduración sobre la producción de embriones in vitro. Tal y como se ha indicado en la revisión bibliográfica, la maduración de los ovocitos

bovinos se ve afectada por numerosos factores, siendo uno de ellos la duración del periodo de maduración. Cuando la duración de este periodo es inapropiada puede ocasionar anomalías en la disposición de la cromatina (Dominko y First, 1997; Hunter y Greve, 1997), el envejecimiento prematuro del ovocito (Hunter, 1989; Hunter y Greve, 1997) y alteraciones en su capacidad para soportar el desarrollo embrionario (Marston y Chang, 1964; Park y col, 2005). Cuando los ovocitos bovinos maduran in vivo en el interior de un folículo, la maduración final se completa en el período comprendido entre la descarga preovulatoria de LH y la ovulación, aproximadamente 30 horas tras el pico de LH. Sin embargo, parece que la maduración nuclear del ovocito (evolución a metafase II) se acelera cuando se cultiva in vitro, ya que la bibliografía demuestra que son suficientes 24 horas para que se complete la maduración nuclear cuando los ovocitos bovinos procedentes de folículos antrales son madurados in vitro (Gliedt y col, 1996). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo coinciden con los descritos en publicaciones anteriores (Long y col, 1994; Gliedt y col, 1996; Lonergan y col, 1997; Ward y col, 2002), en los que se demostró que a medida que se incrementaba la duración del período de maduración se reducían los porcentajes de blastocistos producidos, observándose únicamente un ligero porcentaje de blastocistos eclosionados cuando los ovocitos maduraron durante 28 horas.

Aunque se ha demostrado que no es imprescindible que los ovocitos hayan completado la maduración para que se produzca la penetración espermática y la descondensación del núcleo del espermatozoide (Niwa y col, 1991; Chian y col, 1992), cuando la fecundación se produce una vez completada la meiosis los resultados obtenidos son los óptimos (Ward y col, 2002). No obstante, también se ha comprobado que cuando se produce un retraso excesivo entre el momento en el que el ovocito alcanza la metafase II y la fecundación provoca una pérdida gradual de su capacidad para ser fecundado y soportar el desarrollo embrionario (First y col, 1988), debido al envejecimiento de los ovocitos, que afecta negativamente a su capacidad para soportar el desarrollo (Hunter, 1989; Hunter y Greve, 1997; Gasparrini y col, 2004). Los ovocitos de mamíferos tiene de manera general una vida fértil muy breve (6-12 horas), y cuando superan este periodo aparecen anomalías en la

funcionalidad de los gránulos corticales y en la disposición de los microtúbulos, lo que puede determinar que el ovocito pueda ser fecundado, pero sea incapaz de soportar el desarrollo embrionario a largo plazo (Long y col, 1994; Hunter y Greve, 1997). Así Gasparinni y col (2008) describieron un deterioro muy importante de su competencia cuando la maduración de los ovocitos se prolongaba más de 24 horas y que eran, probablemente, el resultado de que los ovocitos inseminados con 27 y 30 horas de maduración presenten un peor aspecto morfológico.

Por otro lado, para que exista la posibilidad de que actúen las gonadotrofinas, es necesario que los CCO's expresen los receptores para la FSH como consecuencia de la traducción en proteínas de las señales procedentes del ARNm. Calder y col, (2003) demostraron que las mayores concentraciones de ARNm asociado a los FSHr se pueden detectar en el período comprendido entre las 0 y 6 horas de maduración, y posteriormente su concentración disminuye. Ello nos permite suponer que los posibles efectos beneficiosos derivados de una sobreexposición a la acción de la FSH, como consecuencia de una mayor duración del período de maduración o por la utilización de r-hFSH, cuya vida media es más prolongada, se vería atenuados por la reducción del número de receptores. Sin embargo, falta por esclarecer que es lo que provoca la mayor tasa de eclosión del grupo derivado de ovocitos madurados durante 28 horas.

Por lo tanto, los cambios en la duración del período de maduración analizados no provocaron ninguna mejoría en lo que se refiere al porcentaje de blastocistos, respecto a las 24 horas empleadas en el resto de los experimentos.

En un último ensayo se evaluó el efecto de realizar la fecundación in vitro en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno, observándose que en estas condiciones se lograban mayores tasas de división, mayores porcentajes de blastocistos y mayor eclosión de los mismos. El empleo de una elevada concentración de oxígeno en la atmósfera utilizada durante el periodo de fecundación in vitro es una práctica habitual, a pesar de que cuando la fecundación se produce in vivo este acontecimiento fisiológico ocurre en el oviducto con tensiones de oxígeno muy bajas (Bishop, 1956; Mastroianni y

Jones, 1965; Fischer y Bavister, 1993). La utilización de atmósferas ricas en oxígeno ha sido justificada por las necesidades de las elevadas concentraciones utilizadas para lograr la fecundación in vitro, que oscilan entre  $0.5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Gordon, 1994). Los espermatozoides son células con una elevada actividad mitocondrial, lo que implica el consumo de elevadas cantidades de oxígeno y que podría provocar una marcada reducción de la presión parcial de oxígeno en el medio. Así, contrariamente a los resultados obtenidos por nosotros, Bermejo-Álvarez y col (2010) al evaluar los efectos de las concentraciones de oxígeno utilizadas durante maduración y fecundación in vitro, encontraron que las bajas concentración de oxígeno durante la fecundación in vitro producen efectos negativos. Sin embargo, la concentración de oxígeno óptima durante la fecundación in vitro puede variar en función del medio utilizado, el volumen del medio de cultivo, la concentración de espermatozoides y el número de CCO. Así, en el ensayo anteriormente citado, se ha utilizado durante la maduración y fecundación un medio indefinido lo que podría ser la causa de las diferencias con nuestros resultados.

El cocultivo de los gametos durante la fecundación in vitro provoca la exposición de los ovocitos y de los embriones a altas concentraciones de sustancias oxígeno reactivas (ROS) procedentes del metabolismo de los espermatozoides (Gasparrini y col, 2008), que unido a la mayor cantidad de radicales libres que se forman cuando se cultiva en presencia altas concentraciones de oxígeno ambiental, podrían afectar negativamente al desarrollo embrionario posterior (Gianaroli y col, 1996). Los efectos adversos de las ROS no se limitan únicamente a los ovocitos y los cigoto, sino que también actúan sobre los espermatozoides, tanto a nivel de su membrana, como de su ADN y de su actividad fisiológica (Agarwal y col, 2005), afectando a la calidad de los mismos. Estos autores realizaron un metaanálisis que les permitió establecer una relación estadísticamente significativa entre los niveles de ROS y los porcentajes de ovocitos fecundados in vitro. Incluso existen diferentes referencias bibliográficas en las que se asocian los niveles de ROS con la infertilidad masculina (Gagnon y col, 1991; Aitken y Fisher, 1994; de Lamirande y Gagnon, 1995; Sharma y Agarwal, 1996; Aitken, 1999; Saleh y Agarwal,



2002; Agarwal y Saleh, 2002; Agarwal y col, 2003; Aitken y col, 2003; Sikka, 2004). El potencial fecundante de los espermatozoides depende de numerosos factores, como la motilidad, la normalidad morfológica y la capacidad para experimentar la reacción acrosómica y unirse a la zona pelúcida. Numerosos estudios han demostrado que bien todos o una gran mayoría de estos factores están influenciados por los niveles de ROS (Agarwal y col, 1994; Aitken y col, 1998; Armstrong y col, 1999; Whittington y col, 1999; Pasqualotto y col, 2000; Gil-Guzman y col, 2001).

Nuestros resultados demuestran que la utilización de bajas concentraciones de oxígeno durante el periodo de fecundación in vitro podría tener un efecto beneficioso, que se refleja tanto en el porcentaje de blastocistos producidos, como sobre la viabilidad de los mismos. Así, se puede comprobar que cuando la fecundación tuvo lugar en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno no solamente se obtuvieron mayores porcentajes de blastocistos, sino que una mayor cantidad de ellos continuaron su evolución, obteniéndose mayores porcentajes de eclosión.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. La sustitución de las fuentes de proteína tradicionales, suero fetal o albúmina sérica, por una macromolécula sintética (PVP-40) en el medio utilizado para la maduración in vitro de los ovocitos bovinos permite obtener porcentajes aceptables de blastocistos.

2. La cinética de maduración nuclear y los porcentajes de blastocistos producidos cuando se emplea una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%) durante la maduración in vitro en un medio libre de proteínas pueden ser similares a las alcanzadas en condiciones de aerobiosis cuando la concentración de glucosa utilizada es apropiada. Ello indica que las rutas metabólicas utilizadas por los ovocitos para la producción de energía durante la maduración son diferentes en función de la concentración de oxígeno presente en la atmósfera de cultivo.

3. Cuando se incorpora EGF al un medio de maduración simple libre de proteínas, en ausencia de otras hormonas proteicas o esteroides, se favorece la expansión de las células del cúmulo, sin favorecer los porcentajes de cigotos divididos ni los porcentajes de blastocistos obtenidos tras la fecundación y cultivo in vitro.

4. El uso de r-hFSH en un medio simple libre de proteínas durante la maduración de los ovocitos bovinos favorece la progresión del ciclo meótico, aunque es necesario realizar más ensayos para definir la dosis óptima y determinar los mecanismos de acción de dicha molécula.

5. Las modificaciones de la duración del período de maduración evaluadas en nuestros experimentos no provocaron ningún efecto beneficioso frente a los resultados obtenidos previamente utilizando un periodo de maduración de 24 horas de duración, que es el que se emplea de forma tradicional.

6. La utilización de una atmósfera con una baja concentración de oxígeno (6%) durante la etapa de fecundación in vitro ejerce un efecto beneficioso, no solo sobre los porcentajes de blastocistos producidos sino, también, sobre la viabilidad de los mismos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A

- Abe H y Hoshi H (2003): Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev* 49, 193–202.
- Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H (1999) Ultrastructure of bovine embryo development from in vitro matured and –fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 53, 325–335.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T y Hoshi H (2002): Accumulation of cytoplasmatic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61, 57–66.
- Abeydeera LR (2002): In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 57, 257–273.
- Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B y Cappai P (2004): Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Anim Reprod Sci* 81, 77–86.
- Adulyanubap R, Techakumphu M y Adulyanubap W (1998): In vitro fertilization of prepubertal calf oocytes. *J Vet Med Sci* 28, 39–46.
- Agarwal A y Saleh RA (2002): Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 29, 817–827.
- Agarwal A, Ikemoto I y Loughlin KR (1994): Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol* 152:107–110.
- Agarwal A, Saleh RA y Bedaiwy MA (2003): Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79, 829–843.
- Agarwal A, Allamaneni SSR, Nallella KP, George AT y Mascha E (2005): Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. *Fertil Steril* 84, 228–231.
- Ahmed S, Omaina A y Kandil M (2001): Factors affecting number of surface ovarian follicles and oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. *Reprod Nutr Dev* 41, 71–77.
- Aitken RJ (1999): The Amoroso lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 115, 1–7.
- Aitken J y Fisher H (1994): Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16, 259–267.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P y Jennings Z (1998): Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59, 1037–1046.
- Aitken RJ, Baker MA y Sawyer D (2003): Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 7, 65–70.
- Alberio R y Palma GA (1998): Development of bovine oocytes matured in a defined médium supplemented with a low concentration of rhFSH. *Theriogenology*, 49, 195.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E y Carabatsos MJ (2001): Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121, 647–653.
- Ali A y Sirard MA (2002a): Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66, 901–905.
- Ali A. y Sirard MA (2002b). The effects of 17 $\beta$ -estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote* 10, 65–71.
- Ali A y Sirard MA (2005): Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. *Reproduction* 130, 303–310.
- Ali AA, Bilodeau JF y Sirard MA (2003): An antioxidant requirement for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and

- development. *Theriogenology* 59, 939-949.
- Ali A, Paradis F, Vigneault C y Sirard MA (2005): The role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 71, 358-367.
- Al-Katanani YM, Webb DW y Hansen PJ (1999): Factors affecting seasonal variation in 90 day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 82, 2611-2615.
- Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF y Hansen PJ (2002): Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci* 85, 390-396
- Allworth A y Albertini D (1993): Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accomplished by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* 158(1),101-112.
- Alvarez JG y Storey BT (1983): Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 29: 548-555.
- Anderiesz C, Fong CY, Bongso A, Trounson AO (2000a): Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6-dimethylaminopurine. *Hum Reprod* 15, 379-388.
- Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, Jones GM y Trounson AO (2000b): Effect of recombinant human gonadotropins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development. *Hum Reprod* 15,1140-1148.
- Andersen MM, Kroll, J, Byskov AG y Faber M (1976): Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J Reprod Fertil* 48, 109-118.
- Anderson GB (1991): Fertilization, early development, and embryo transfer. In: Cupps P.T. (Ed.), *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, Inc. San Diego, California, pp. 279-313.
- Apa R, Lanzone A, Miceli F, Mastrandrea M, Caruso A, Mancuso S y Canipari R (1994): Growth hormone induces in vitro maturation of follicle-and cumulus-enclosed rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 106: 207-212.
- Araki N, Sato K, Hayashi K, Miyamoto A y Fukui Y (1998): Relationships among follicular fluid estradiol-17-beta concentration, morphology of cumulus-oocyte complex and developmental capacity of individually matured, fertilized and cultured bovine oocytes in vitro. *J Reprod Develop* 44: 359-365
- Arav A (2001): Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology* 55(7):1561-1565.
- Argov N, Moallem U y Sklan D (2005): Summer heat stress alters the mRNA expression of selective-uptake and endocytotic receptors in bovine ovarian cells. *Theriogenology* 64: 1475-1489.
- Arlotto T, Lebfried-Rutledge ML y Frist N (1990): Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocyte from two localization in the ovary. *Theriogenology* 33:188.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL y Leibfried-Rutledge ML (1996): Aspectsof follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation anddevelopment of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 943-956.
- Armstrong DT (2001): Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55: 1303-1322.
- Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Peterson BA, Stubbings RB, McLean D, Setevens G, Seamark RF (1992): Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 38: 667-678.
- Armstrong DT, Irvine B, Earl CR, McLean D, Seamark RF (1994): Gonadotropin simulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 42:1227-36
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ y Sikka SC (1999): Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 26: 869-80.

Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M y Tsafiriri A (2005): Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146: 77–84.

Assey RJ, Hyttel P y Greve T (1995): Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42:437-43.

Avery BT y Greve T (1995): Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*. 44: 871-878.

Ax RL, Gilbert GR y Shook GE (1987): Sperm in poor quality semen from bulls during heat stress have a lower affinity for binding hydrogen-3 heparin. *J Dairy Sci* 70:195.

## B

Ball GD y First NL (1983): Fertility of ejaculated bull sperm in vitro after exposure to caffeine and cAMP. *J Anim Sci* 57: 317.

Bagavandoss P, Midgley AR y Wicha M. (1983): Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 31: 633–640.

Balakier H, Sojecki A, Motamedi G y Librach C (2004): Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Hum Reprod* 19: 982–987.

Banwel K, Lane M y Russell K (2007): Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod* 22: 2768-2775.

Barnes FL (2000): The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 53:649–658.

Barnes FL y First NL (1991): Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29: 117–123.

Bashan N, Burdett E, Hundal HS y Klip A (1992): Regulation of glucose transport and Glut 1 glucose transporter expression by O<sub>2</sub> in muscle cells in culture. *Am J Physiol* 262: 682-690.

Bauchart D (1993). Lipid absorption and transport in ruminants. *J Dairy Sci* 76: 3864–3881.

Bavister BD (1995): Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1:91-148.

Bavister BD y Yanagimachi R (1977): The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 16, 228-237.

Bavister BD, Rose-Hellekant TA y Pinyopummintr T (1992): Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37:127.

Behalova E y Greve T (1993): Penetration rate of cumulus-enclosed versus denuded bovine eggs fertilized in vitro. *Theriogenology* 39:186 (Abstract).

Behboodi E, Groen W, Destempes MM, Williams JL, Ohlrichs C (2001): Transgenic production from in vivo-derived embryos: effect on calf birth weight and sex ratio. *Mol Reprod Dev* 60: 27-37.

Bermejo-Álvarez P, Lonergan P, Rizos D y Gutiérrez-Adán A (2010): Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reproductive BioMedicine Online* 20: 341-349.

Beker ARCL, Colenbrander B y Bevers MM (2002): Effect of 17β-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 58: 1663-1673.

Beker-Van Woudenberg AR, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Colenbrander B y Bevers MM (2004): Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol Reprod* 70: 1465–1474.

- Betteridge KJ (1995): Philogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 44:1061-98.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP y King WA (1989): Potential genetic improvement of cattle by fertilitation of fetal oocytes in vitro. *J Reprod Fert* 38: 87-98.
- Biggers JD, Whittingham DG y Donahue RP (1967): The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci* 58:560-567
- Bishop D (1956): Oxygen concentration in the rabbit genital tract. En: *Proceedings of the Third International Congress of Animal Reproduction*, Cambridge, 53-58.
- Blanco MR, Demyda S, Moreno Millán M y Genero E (2011): Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 6(7), 155-165.
- Block J y Hansen PJ (2007): Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro-produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 67: 1518-1529.
- Block J, Bonilla L, y Hansen PJ (2010): Improving the efficacy of in-vitro embryo transfer in lactating dairy cows: use of a novel embryo culture medium to improve embryo development, survival following vitrification and pregnancy success. *J Dairy Sci* 93: 5234-5242
- Blondin P y Sirard MA (1995): Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 41 :54-62
- Blondin P, Guilbault LA y Sirard MA (1995): In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 43: 168.
- Blondin P, Coenen K, Guilbault LA y Sirard MA (1997): In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47:1061-1075.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F y Sirard MA (2002): Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes, *Biol Reprod* 66: 38-43.
- Boatman DE y Robbins RS (1988): Evidence for an acrosome reaction inducing factor (ARIF) distinct from serum albumin in hamster cumulus oophorus. *Biol Reprod* 38 (Suppl 1):139.
- Boediono A, Rajamahendran R, Saha S, Sumantri C y Suzuki T (1995): Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. *Theriogenology* 43: 169.
- Bolamba D, Russ KD, Harper SA, Sandler JL y Durrant B (2006): Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology* 65: 1037-1047.
- Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ y Gosden RG (1994): The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vitro. *Hum Reprod* 9: 617-623.
- Boni R, Tosti E, Roviello S y Dale B (1999): Intracellular communication in in vivo and in vitro produced bovine embryos, *Biol Reprod* 61:1050- 1055
- Brackett BG y Oliphant G (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 12: 260-274
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF y Dressel ML (1982): Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27: 147-158.
- Bredbacka K y Bredbacka P (1996): Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 106: 169-172.
- Bredbacka K y Bredbacka P (1996): In vitro production of cattle blastocysts in chemically defined medium with or without insulin supplementation. *Agric Food Sci Finland* 5: 509-514.
- Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P y Laible G (2003): Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein. *Nat Biotechnol* 21:157-162.
- Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ y Eppig JJ (1990): FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro



- is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* 138:16–25.
- Buyalos RP y Cai X (1994): Preimplantation embryo development enhanced by epidermal growth factor. *J Assist Reprod Genet* 11:33-37.
- Byrd W (1981): In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J Exp Zool* 215(1):35-46.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR y Keese HJ (1999): Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 117:97-105.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR y Leese HJ (2002): Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 62: 489-495.
- Byskov A, Anderson C, Hossaini A y Guoliang X (1997): Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiotic-activating substances when stimulated with FSH. *Mol Reprod Dev* 46:296–305.
- ## C
- Cainzos J, Becerra J, Quintela L, Huanca T, Huanca W y Herradón PG (2008): The use of IVF embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Reprod Dom Anim* 43 (s4) 57
- Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME y Watson AJ (2001): Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol Reprod* 65: 135–140.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ (2003): Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod Biol Endocrin* 1:14.
- Calvin HI, Grosshans y Blake EJ (1986): Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res* 14:265-275.
- Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM y Araújo MCC (2002): Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozóide na fecundação in vitro em bovinos da raça Gir. *Pesq Agrop Bras* 37:709-715.
- Camous S, Heyman Y, M'ezou W y Menezo Y (1984): Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil* 72: 479–85.
- Carolan C, Monaghan P, Gallagher M y Gordon I (1994): Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 41, 1061–1068.
- Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A y Mermillod (1995): Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 43: 1115–1128
- Caucig H, Friedrich F, Hager R y Golob E (1971): Enzymes in follicular and cyst fluid in human ovaries. *Acta Endocr* 66:52.
- Cavilla JL, Kennedy CR y Baltzen M (2001): The effects of meiosis activation sterol on in-vitro maturation and fertilization of human oocytes from stimulated and unstimulated ovaries. *Hum Reprod* 16: 547-555.
- Cetica P, Dalvit G y Beconi M (1999): Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *Biocell* 23(1): 125-133.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G y Beconi M (2002). Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 124: 675-681.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G y Beconi M (2003): Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 126: 753-763.

- Chabot JG, St-Arnaud R, Walker P y Pelletier G (1986): Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 44:99-108.
- Chan, AWm Homan EJ, Ballou LU, Burns JC y Bremel RD (1998): Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Prod. Natl. Acad. Sci.* 95:14028-14033.
- Chang, SCS, Jones JD, Ellefson RD y Ryan RJ (1976): The porcine ovarian follicle. I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol Reprod* 15: 321-328.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, Riesen JW, Tian X y Yang X (2006): Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65, 1631-1648.
- Checura CM y Seidel GE Jr (2007): Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology* 67: 919-30.
- Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M y Larsen WJ (1990): Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 26: 236-247
- Chen L, Russell PT y Larsen WJ (1993): Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 34: 87-93.
- Chen SH, Vaught TD, Monahan JA, Boone J y Emslie E (2002): Efficient production of transgenic cloned calves using preimplantation screening. *Biol Reprod* 67:1488-1492.
- Chian RC, Niwa K y Nakahara H (1992): Effect of sperm penetration in vitro on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J Reprod Fertil* 96: 73-78.
- Chian RC, Okuda K y Niwa K (1995): Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *Anim Reprod Sci* 38: 37-48.
- Chian RC, Park CK y Sirard MA (1996): Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 258 (Abstract)
- Chian RC, Gilbert L y Huang JY (2009): Liv birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril* 91: 372-376.
- Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE Jr, y Squire EL (2001): Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 56: 661-670.
- Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L y Shaw RW (1997): Follicular vascularity: the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod* 12: 191-196.
- Colonna R y Mangia F (1983): Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biol Reprod* 28: 797-803.
- Chung JT, Tosca L, Huang TH, Xu L, Niwa K y Chian RC (2007): Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation in vitro and subsequent fertilization and embryonic development. *Reprod Biomed Online* 15(2):198-207.
- Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C y Albertini DF (2002): Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* 17: 1006-1016.
- Cortvrindt R, Hu Y, Smits J (1998): Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod* 13, 1292-1302.
- Coskun S y Lin YC (1994): Effects of transforming growth factors and activin A on in vitro porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 38: 153-159.
- Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC y Rikihisa Y (1991): Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology* 36:485-494.

Coulam CB, Goodman C y Rinehart JS (1999): Colour Doppler indices of follicular blood flow as predictors of pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* **14**: 1979-1982.

Cox JF, Hormazabal J y Santa Maria A (1993): Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology* **40**: 1259-1267.

Cran DG y Cheng WTK (1986): The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Gamete Res* **13**:241-251.

Crozet N y Dumont M (1984): The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res* **10**:97-105.

Czyzyk-Krzeska MF (1997): Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaption to hypoxia. *Respiration Physiology* **110**: 99-111.

## D

Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M y Cetica P (2005). Effect of alpha-tocopheron and ascorbic acid in bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Dom Anim* **40**: 93-97

Damiani P, Bellow MS, Walstra M y Looney CR (1996a): Repeatable transvaginal ultrasound-guided aspirations of prepubertal calves. En: *Proceedings 13th International Congress on Animal Reproduction*, Sydney, Vol 2, p. 18-14.

Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM y Duby RT (1996b) Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev* **45**: 521-534.

Damiani P, Fissore RA y Duby RT (1998): Biochemical and physiological maturation of cow and calf oocytes. *Theriogenology* **49**: 310 .

Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR y Leung BS (1991): Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human cocytes. *Fertil Steril* **55**: 1000-1004.

De Castro e Paula LA y Hansen PJ (2007): Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* **68**:763-770.

De La Fuente R, O'Brien MJ y Eppig JJ (1999): Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod* **14**: 3060-8.

de Lamirande E y Gagnon C (1995): Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* **10**(Suppl 1):15-21.

De Loos F, Zeinstra E y Bevers MM (1994): Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocyte cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* **39**:162-165.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF y Baldassarre H (1995): Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev* **42**:432-436.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG y Matkovic M (1996): Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* **45**:451-457.

De Sousa PA, Westhusin ME y Watson AJ (1998): Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. *Mol Reprod Dev* **49**: 119-130.

De Wit AA, Wurth YA y Kruip TA (2000): Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci* **78**:1277-83.

Dekel N y Sherizly I (1985): Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes. *Endocrinology* **116**: 46-49.

Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V y Lacalandra GM (1997): Effects of follicular fluid supplementation of in

- vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 2766–2772.
- Diaz-Cueto L y Gerton GL (2001): The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res* 32: 619-626.
- Dieleman SJ, Kruip TA, Fontijne P, de Jong WH y van der Weyden GC (1983): Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J. Endocrinol* 97: 31-42.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H y Gadella BM (2002): Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57: 5-20.
- Ding J y Foxcroft GR (1994): Epidemral growth factor enhances oocytes maturation in pigs. *Mol Reprod Dev* 39: 30-40.
- Dobrinsky JR, Johnson LA y Rath D (1996): Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* 55: 1069–1074.
- Dode MA, Rodavalho NC, Ueno VG y Fernandes CE (2002): The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci* 69: 15-23.
- Dominko T y First NL (1992): Kinetic of bovine oocytes maturation allows selection for development donors: promises and problems. *Theriogenology* 45:121-131.
- Dominko T y First NL (1997): Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 47: 456–467.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N y Matzuk MM (1996): Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383: 531-535.
- Downs SM (1989): Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol Reprod* 41: 371-379.
- Downs SM (1993): Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39: 65-80.
- Downs SM (1997): Hypoxanthine regulation of oocyte maturation in the mouse: insights using hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient animals *Biol Reprod* 57: 54–62
- Downs SM and Dow MPD (1991): Hypoxanthine maintained 2-cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of HGPRT inhibitors *Biol Reprod* 44: 1025-1039
- Downs SM, Schroeder AC y Eppig JJ (1986): Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing the hardening of the zona pellucida. *Gamete Res* 15: 115–122.
- Downs SM, Humpherson PG, Martin KL y Leese HJ (1996): Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 44:121-131.
- Downs S, Humpherson P y Leese H (2002): Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev* 62: 113-123.
- Downs SM, Gilles R, Vanderhoef C, Humpherson PG y Leese HJ (2006): Differential response of cumulus cell-enclosed and denuded mouse oocytes in a meiotic induction model system. *Mol Reprod Dev* 73: 379-389.
- Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT y Gilchrist RB (2005): Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 146 :2798–2806.
- Driancourt MA (1991): Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35:55-79.

- Driancourt MA (2001): Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.
  - Driancourt MA, Thuel B, Mermillod P y Lonergan P (1998): Relationship between oocyte quality (measured after IVM, IVF and IVC of individual oocytes) and follicle function in cattle. *Theriogenology* 49: 345.
  - Druker BJ, Mamon HJ, Roberts TM (1989): Oncogenes, growth factors and signal transduction. *N Engl J Med* 321:1383-1391.
  - Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Jones ME, Kerr JB, O'Donnell L, Simpson ER y Findlay JK (2002): Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 191:27-33.
  - Duby RT, Damiani P, Looney CR, Long CR, Balise JJ y Robl JM (1995): Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology* 43, 202
  - Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore REA y Robl JM (1996): Prepubertal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology* 45:121-130.
  - Duby RT, Hill JL, O'Callaghan D, Overstrom EW y Boland MP (1997): Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* 47: 332
  - Duranthon V y Renard JP (2001): The developmental competence of mammalian oocytes: A convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55, 1277-1289.
- E**
- Earl CR, Fry RC, Maclellan LJ, Kelly JM y Armstrong DT (1998): In vitro fertilization and developmental potential of prepubertal calf oocytes. En: Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G. and Gianaroli, L. (eds) *Gametes: Development and Function*. Serono Symposia Rome, pp. 115-137.
  - Ebert BL, Firth JD y Ratcliffe PJ (1995): Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *J Biol Chem* 270: 29083-29089
  - Edwards RG (1965): Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349-351.
  - Edwards, RG (1974): Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 37: 189-219.
  - Edwards JL y Hansen PJ (1996): Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol Reprod* 55: 341-346.
  - el-Fouly MA, Cook B, Nekola M y Nalbandov AV (1970): Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 87: 286-293.
  - El-Gaafary MN (1994): Quality and Fertility of cooled rabbit semen supplemented with cyclic-AMP stimulators. *Anim Reprod Sci* 34: 307-313.
  - Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME y Foote RH (1990): Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol Reprod* 43, 97-104.
  - Ellington JE, AW Padilla, WL Vredenburgh, EP Dougherty y RH Foot (1991): Behavior of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell co-culture: An in vitro model for studying the cell interactions of reproduction. *Theriogenology* 35: 977-995
  - Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM y Matzuk MM (1999): Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13: 1035-1048.
  - Eppig JJ (1991): Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays* 13: 569-574.
  - Eppig JJ (1996): Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8:485-489.

- Eppig JJ (2001): Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829–838.
- Eppig JJ y Downs SM (1984): Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod* 30: 1-11.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF y Coleman DL (1985): Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod* 33: 1041-1049.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F y Hirao Y (1997): Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56: 976-984.
- Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE y Biggers JD (1994): Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 345: 1027–1033.
- Eroglu A (1993): Experimental studies on in vitro maturation of porcine oocytes. Part II. Effects of estradiol-17 beta and progesterone. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106:157-159
- Espey LL y Lipner H (1994): Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*, pp 725–780. Eds E Knobil y JD Neill. New York: Raven Press.
- Eyestone WH y de Boer HA (1993): FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology* 39: 216.
- Eyestone WH (1999): Production and breeding of transgenic using in vitro embryo production technology. *Theriogenology* 51:509-517.
- F**
- Fair T (2003): Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78. 203-216.
- Fair T, Hyttel P y Greve T (1995): Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42: 437–42.
- Farin PW, Crosier AE y Farin CE (2001): Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55: 151-170.
- Farin PW, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herrick JR y Kennedy-Stoskopf S (2007): The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro\_ C.E. *Anim Reprod Sci* 98: 97–112
- Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colenbrander B y Bevers MM (2002): Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology* 57: 1347-1355.
- Fazio RA, Hockett ME, Edwards JL, Rohrbach NR y Schrick FN (1999): Effects of body condition and/or pregnancy status on developmental potential of bovine oocytes. *Theriogenology* 51: 223.
- Feng P, Knecht M y Catt KJ (1987): Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 120:1121-1126.
- Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, Bao S y Tan JH (2007): Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 67(8),1339-1350.
- Fiorenza MT y Mangia F (1992): Hyperthermia specifically inhibits bivalent chromosome disjunction in maturing mouse oocytes. *Biol Reprod* 46, 658-664.
- First NL y Parrish JJ (1987): In vitro fertilization of ruminants. *J Reprod Fertil Supplement* 34: 151-165.
- First NL, Leibfried-Rutledge ML y Sirard MA (1988): Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog Clin Biol Res* 267: 1–46.
- Firth JD, Ebert BL, Pugh CW y Ratcliffe PJ (1994): Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc natl Acad Sci* 91: 6496–6500.

- Firth JD, Ebert BL y Ratcliffe PJ (1995): Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A: interaction between hypoxia inducible factor 1 and cyclic AMP response elements. *J Biol Chem* 270: 21021–21027.
- Fischer B y Bavister BD (1993): Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkey, hamsters, and rabbits. *J Reprod Fertil* 99: 673–679.
- Fischer-Brown A, Monson R, Parrish J y Rutledge J (2002): Cell allocation in bovine embryos cultured in two media under two oxygen concentrations. *Zygote* 10:341-348.
- Fischer-Brown A, Crooks A, Leonard S, Monson R, Northey D y Rutledge JJ (2005): Parturition following transfer of embryos produced in two media under two oxygen concentrations. *Anim Reprod Sci* 87:215-228.
- Fortune JE y Hansel W (1985): Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod* 32:1069-1079
- Fortune JE, Rivera GM y Yang MY (2004): Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 82-83: 109-126.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K y Toyoda Y (1990): Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 42:114-119.
- Fukui Y (1990): Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 26: 40–46.
- Fukui Y y Ono H (1989): Effects of sera, hormones, and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 86: 501–506. [11]
- Fukui Y, Fukushima M, Terawaki Y y Ono H (1982): Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology* 18:161-175.
- Fukui Y, Imai K, Alfonso NF y Ono H (1987): Follicle culture enhances fertilizability and cleavage of bovine oocytes matured in vivo. *J Anim Sci* 64: 935-941.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA y Tervit HR (1991): Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 92:125.
- Fukui Y, Kikuchi Y, Kondoy H y Mizushima S (2000). Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 1553– 65
- Fulka JJr, Pavlok A y Fulka J (1982): In vitro fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil* 64: 495.
- Funahashi H, Cantley T, Stumpf T, Terlouw S y Day B (1994): Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod* 51:633-639
- Funahashi M, McIntosh EW y Smith MF (1997): Effect of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) on early development of swine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 47: 277.
- ## G
- Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E y Kovalski N (1991): Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann NY Acad Sci* 637:436–44.
- Gall L, Chene N, Dahirel M, Ruffini S y Boulestiex C (2004): Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulusoocyte complex. *Molecular Reproduction and Development* 67: 439–445.
- Galli C., Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R y Lazzari G (2001): Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6): 1341-1357.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N y Colleoni S (2003): Bovine

- embryo technologies. *Theriogenology* 59: 599–616.
- Galway AB, Lapolt PS, Tsafiri A, Dargan CM, Boime I y Hsueh JW (1990): Recombinant folliclestimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 127: 3023–3028.
- Gandh AP, Lane M, Gardner DK y Krisher RL (2000): A single medium supports development of bovine embryo throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reprod.*, 15(2): 395-401.
- Gandolfi F, Pocar P, Milanesi E, Brevini TAL, Luciano AM y Armstrong DT (1996): Comparative analysis of metabolic activity and protein synthesis during IVM of calves and cow oocytes. *Biol Reprod* 54 (suppl. 1), 157.
- Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TAL, Acocella F, Lauria A y Armstrong DT (1998): Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 49:168–175
- Gandolfi F, Vassena R y Lauria A (2000): The developmental competence of the oocyte before puberty: is something missing? *Reprod Domest Anim* 35: 66–71.
- Gandolfi B y Gandolfi F (2001): The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 55:1255–76.
- Garbers DL, First NL, Sullivan JJ y Lardy HA (1971): Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biol Reprod* 5: 336-339.
- Gardner DK (1994): Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int* 18: 1163-1179.
- Gardner DK (1998): Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 4:83–102.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J y Schoolcraft WB (2001): Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 76:1175–1180.
- Gardner DK y Lane M (2003): Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 6:470-481.
- Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Di Palo R, Campanile G y Zicarelli L (2004): Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-parthenogenetic development. *Theriogenology* 62 (9), 1627–1637.
- Gasparrini B, De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Di Palo R, Campanile G y Zicarelli L (2008): Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci* 105:354-364.
- Gassmann M, Fandrey J, Bichet S, Wartenberg M, Marti HH y Bauer C (1996): Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 93:2867–72.
- Gérard N, Loiseau S, Duchamp G y Seguin F (2002): Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1HNMR). *Reproduction* 124: 241–248.
- Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N y Nagai T (2000): Effects of sodium pyruvate in non-serum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* 63, 1730-1734.
- Gianaroli L., Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Tosti E y Panzella S (1996): Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in vitro fertilization improves the implantation rate. *Hum Reprod* 11, 166–171.
- Gilchrist RB, Ritter LJ y Armstrong DT (2004): Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82–83: 431–446.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA y Hickey TE (2006): Molecular basis of oocyte-paracrine



- signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci* 11, 3811–3821.
- Gilchrist RB y Thompson JG (2007): Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67: 6–15.
- Gilchrist RB, Lane M y Thompson JG (2008): Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod* 14(2): 159-177.
- Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, et al. (2001): Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16:1922–30.
- Glasgow IK, Zeringue HC, Beebe DJ, Choi SJ, Lyman JT, Chan NG y Wheeler MB (2001): Handling individual mammalian embryos using microfluidics. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 48: 570–577.
- Gliedt DW, Rosenkrans CF, Rorie RW y Rakes JM (1996): Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time and heparin on bovine embryo development. *J Dairy Sci.* 79:532-535.
- Goldsborough MD, Tilkins ML, Price PJ, Lobo-Alfonso J, Morrison JR, Stevens ME, Meneses J, Pedersen R, Koller By Latour A (1998). Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells. *Focus* 20: 8–12.
- Gomez E y Diez C (2000): Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Anim Reprod Sci.* 58: 23-37.
- Gonzalez, R., Soto-Belloso, E., Delgado, N., Portillo, G., DeOndiz, A. y Velarde, J. (1992): Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. *Revista Científica- LUZ* 2: 11-13.
- Gordon I (1994): Laboratory production of cattle embryos. En: *Biotechnology in agriculture*. Wallingford: CAB International (United Kindom)
- Gordon, I (2003): Laboratory production of cattle embryos. 2º edition. En: *Biotechnology in agriculture series*. Wallingford: CAB International (United Kindom)
- Gordon I y Lu KH (1990): Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33: 77-87.
- Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C y Brown N (1988): Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil* 82: 813-825.
- Gosden RG y Bownes M (1995): Cellular and molecular aspects of oocyte development. En: Yovich JL (ed), *Gametes-The oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press, 23-53.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y y Ogawa K (1988): Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J Reprod Fertil* 83:753-758.
- Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, de Sutter P y Dhont M (1998): In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod* 13: 1638–1644
- Greve T, Xu KP, Callesen H y Hyttel P (1987): In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 4:281–285.
- Gruppen CG, Nagashima H y Nottle MB (1997): Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured in vitro: a cause of polyspermic fertilization? *Reprod Fert Develop* 9:187–191
- Grondahl C, Greve T, Schmidt M y Hunter RHF (1996): Bovine preovulatory follicles are cooler than ovarian stroma and deep rectal temperature. *Theriogenology* 45: 289.
- Guerin P, El Mouatassim S y Ménézo Y (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7:75-89.
- Guilbault LA, Rouillier R y Matton P (1992): In vitro release of estradiol and level of atresia of subordinate follicles collected during the growing or regressing phase

- of follicular dominance in cattle. *Theriogenology* 37:218 [abstract]
- Guler, N, Poulin, P, Mermillod, M, Terqui y. Cognié Y (2000): Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 54: 209-218.
- Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B y De la Fuente J (2001): Effect of the in vitro culture systems on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55: 1117-1126.
- Gwatkin RBL y Haidri AA (1974): Oxygen requirements for the maturation of hamster oocytes. *J Reprod Fertil* 37:127-129
- Gyu-jin R, Balasubramanian S, Dong-sik K, Son WJ, Cho SR, Kim JG (2007): Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of hanwoo calves following embryo transfer. *Mol Reprod Dev* 74:486-496.
- ## H
- Hagemann LJ (1999): Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51: 449-59.
- Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A y Peterson AJ (1999): Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev* 53: 451-8.
- Haidri AA, Miller IM, Gwatkin RBL (1971): Culture of mouse oocytes in vitro, using a system without oil or protein. *J Reprod Fertil* 26: 409-411 .
- Hall JM, Couse JF y Korach KS (2001): The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276: 36869-36872.
- Hammond JM, Lino J, Baranao S, Skaleris D, Knight AB, Romanus JA y Rechler MM (1985): Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 117: 2553-2555.
- Hammon DS, Wang S y Holyoak GR (2000): Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. *Anim Reprod Sci* 58: 1-8
- Handrow RR, Lenz RW y Ax RL (1982): Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochemical Biophys Research Communication* 107: 1326-1332.
- Hansen PJ y Block J (2004): Towards an embryonic world: the current and potential uses of embryo Technologies in dairy production. *Reprod Fert Develop* 16: 1-14.
- Harper KM y Brackett BG (1993): Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod* 48: 409-416.
- Harvey AJ (2007): The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98: 113-128.
- Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG (2002): Redox regulation of early embryo development. *Reproduction* 123:479-486.
- Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT y Thompson JG (2004): Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 71: 1108-1119.
- Harvey AJ, Kind KL y Thompson JG (2007): Regulation of gene expression in bovine blastocysts in response to oxygen and the iron chelator desferrioxamine. *Biol Reprod* 77:93-101.
- Hashimoto S, Takakura R, Minami N y Yamada M (1999): Ultrasound-guide follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. *Theriogenology* 52:131-138.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H y Kashima N (2000a): Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 57: 353-360.

- Hashimoto S, Minami N, Yamada M y Imai H (2000b): Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev* 56: 520-526.
- Hashimoto S, Murata Y, Kikkawa M, Sonoda M, Oku H, Murata T, Sugihara K, Nagata F, Nakaoka Y, Fukuda A y Morimoto Y (2007): Successful delivery after the transfer of twice-vitrified embryos derived from in vitro matured oocytes: a case report. *Hum Reprod* 22: 221-223.
- Hasler JF (1993): Applications of in vitro fertilization technology to infertile dairy cows. En: *Proceedings of 12th Annual Convention of American Embryo Transfer Assoc*; Portland, ME: 43-52.
- Hasler JF (2000): In vitro culture of bovine embryos in Menezes's B2 medium with or without coculture and serum: The normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim Reprod Sci* 60-61:81-91.
- Hawk HW y Wall RJ (1994): Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41: 1571-1583
- Heindryckx B, De Sutter P, Gerris J, Dhont M y Van der Elst J (2007): Embryo development after successful somatic cell nuclear transfer to in vitro matured human germinal vesicle oocytes. *Hum Reprod* 22:1982-1999.
- Heleil B, Torner H, Alm H y Kuzmina T (2000): Effect of follicle size and bovine prolactin on quality of bovine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology* 53: 356.
- Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM y Dieleman SJ (2000): Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53: 11-20.
- Henricks DM, Kouba AJ, Lackey BR, Boone WR y Gray SL (1998): Identification of insulinlike growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol Reprod* 59: 330-337
- Henriksen PJM, van de Leemput EE, Vos PLAM, Bevers MM y Dieleman SJ (1998): Comparisons of the efficiency of in vitro versus in vivo maturation of bovine oocytes using a superovulation procedure enabling controlled duration of in vivo maturation. En: Lauria A, Gandolfi F, Enne G y Gianaroli L (eds) *Gametes: Development and Function*. Sero Symposium, Rome, p. 545
- Henriksen PJM., Vos PLAM, Bevers MM y Dieleman SJ (1999): Is bovine oocyte competence further improved during follicular development between 8 mm and the preovulatory size? En: *Proceedings 15th Meeting European Embryo Transfer Association*, Lyon, p. 164
- Herradón PG, Quintela LA, Becerra JJ, Ruibal S y Fernandez M (2007): Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim* 15 (Supl. 1): 34-41. [10]
- Heyting C (1996): Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 8:389-396.
- Hidalgo CO, Fernández I, Duque P, Facal N, Díaz E, Prendes JM, Menéndez J, Gómez E, Prieto L y Díez C (2002): Primeros terneros producidos in vitro tras punción ecogiada de folículos ováricos. *Arch Zootec* 51:411-422.
- Hill DJ (1989): Growth factors and their cellular actions. *J Repro Fertil* 85: 723-734
- Hill JL, Hammar K, Smith PJ y Gross DJ (1999): Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca<sup>2+</sup> efflux in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 53: 244-253.
- Hirao Y y Eppig JJ (1997): Parthenogenetic development of mos-deficient mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 48, 391-396.
- Holm P, Walker SK y Seamark RF (1996): Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil* 107: 175-81.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T y Callesen H (1999): High bovine blastocysts development in a static in

- vitro production systems using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 883-700.
- Holm P, Booth PJ y Callesen H (2002): Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 123: 553-565.
- Hoodbhoy T y Talbot PR (1994): Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 39: 439-48.
- Hosoda K y Terada T (2007): Bovine Follicular Fluid Contains Antagonist Activity for Cumulus Expansion Promoting Effect by Epidermal Growth Factor. *Reprod Dom Anim* 42: 225-229.
- Hsu C y Hammond JM (1987): Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine cells in vitro. *Endocrinology* 120: 198-207.
- Hsu CJ, Holmes SD y Hammond JM (1987): Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem Biophys Res Commun* 147:242-247.
- Hue I, Dedieu T, Huneau D, Ruffini S, Gall L y Crozet N (1997): Cyclin B1 expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 47: 222-228.
- Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H y Callesen H (2005): Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes, *Theriogenology* 63: 1149-1166.
- Hunt JV, Dean RT y Wolff SP (1988): Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256: 205-212.
- Hunter RHF (1989): Aging of the unfertilized cow egg in vivo: how soon is fertility compromised. *Vet Rec* 124:489-490.
- Hunter RHF (1991): Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* 29: 385-391.
- Hunter RHF (1993): Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol Reprod Dev* 35:324-327.
- Hunter AG y Moor RM (1987): Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci* 70: 1646-1651.
- Hunter RHF y Greve T (1997): Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod Dom Anim* 32:137-141.
- Hunter RHF y Einer-Jensen N (2005): Pre-ovulatory temperature gradients within mammalian ovaries: a review. *J Anim Physiol Anim Nutr* 89: 240-243.
- Hunter RHF, Grøndahl C, Greve T y Schmidt M (1997): Graafian follicles are cooler than neighbouring ovarian tissues and deep rectal temperatures. *Hum Reprod* 12: 95-100.
- Hunter RHF, Bøgh IB, Einer-Jensen N, Müller S y Greve T (2000): Pre-ovulatory Graafian follicles are cooler than neighbouring stroma in pig ovaries. *Hum Reprod* 15: 273-283.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB (2005): Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118: 5257-5268.
- Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB (2006): Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 296: 514-521
- Hyttel P, Callesen H y Greve T (1986): Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil* 76: 645-656.
- Hyttel P, Greve T y Callesen H (1989): Ultrastructure of oocyte maturation and fertilization in superovulated cattle. *Dev Ultrastr Reprod* 287-297.

I

- Ijaz A, Lambert RD y Sirard MA (1994): In-vitro cultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm-motility-maintaining factor (s). *Mol Reprod Dev* 37: 54-60.
- Ikeda S, Nishikimi A, Ichihara K, Muramatsu T y Yamada M (2000): Effect of recombinant bovine midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Theriogenology* 53: 455.
- Iritani A (1991): Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. *Mol Reprod Dev* 28: 199-207.
- Iritani A y Niwa K (1977): Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *Reprod Fert* 50: 119-121
- Irvine B, Armstrong DT, Earl C, McLean D y Seamark RF (1993): Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39:237.
- Iwasaki S, Hamano S, Kuwayama M, Yamashita M, Ushijima H, Nagaoka S y Nakahara T (1992): Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized in vitro. *J Exp Zool* 261: 79-85
- Iwamoto M, Onishi A, Fuchimoto D, Somfai T, Takeda K, Tagami T, Hanada H, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T y Kikuchi K (2005): Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology* 63: 1277-1289.
- Iwata H, Akamatsu S, Minami N y Yamada M (1998): Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology* 50: 365-375.
- Iwata H, Minami N y Imai H (2000): Postnatal weight of calves derived from in vitro matured and in vitro fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod Fert Dev* 12: 391-396.
- Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K y Miyake M (2004): Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 127: 159-164.
- Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM (1998a): Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 51: 339-345.
- Izadyar F, Zeinstra E, Colenbrander B, Venderstichele HMG y Bevers MM (1998b). In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of bovine activine A does not affect embryonic development. *Anim Reprod Sci* 45: 37-45.
- Izquierdo D (1996): Cultivo de embriones caprinos producidos in vitro. Universidad Autónoma de Barcelona.

J

- Jewgenow K, Heerdegen B, Muller K (1999): In vitro development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia. *Theriogenology* 51: 745-56.
- Johnson AE, Bormann CL, Knee AM, Swain JE, Gibbons JR y Krisner RL (2001): Developmental competence of bovine oocytes retrieved from 5 and 10 mm follicles of a new follicular wave. *Theriogenology* 55: 405 [abstract]
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK y Tilly JL (2004): Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145-150.
- Joyce IM, Clark AT, Pendola FL y Eppig JJ (2000): Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 63: 1669-1675.
- Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ y McNatty KP (2002): Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine

fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* **191**: 1-10.

## K

- Kajihara Y, Blakewood EG, Myers MW, Kometani N, Goto K y Godke RA (1991): In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology* **35**(1): 220.
- Kanaya H, Murata Y, Oku H, Hashimoto S, Morimoto Y, Murata T, Sugihara K, Nagata F, Nakaoka Y y Fukuda A (2006): Successful monozygotic twin delivery following in vitro maturation of oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome: case report. *Hum Reprod* **21**:1777-1780.
- Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahceci M (2004): Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed Online* **9**: 409-417.
- Karja NWK, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T (2004): Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology* **62**: 1585-1595.
- Katska L (1984): Comparison of two methods for recovery of ovarian Oocytes from slaughter cattle. *Anim Reprod Sci* **7**: 461-463
- Katska L, Kauffold P, Smorag Z, Duschinski V, Torner H y Kanitz W (1989): Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* **32**: 767-777.
- Kelly EC, Rowe J y Armstrong DT (1997): Blastocyst production rates from different grades of oocytes collected from 2 to 3 month old calves. *Theriogenology* **47**: 291
- Keskintepe L y Brackett BG (1996): In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* **55**: 333-339.
- Keskintepe L, Burnley CA y Brackett BG (1995): Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol Reprod* **52**: 1410-1417.
- Khatir H, Lonergan P, Carolan C y Mermillod P (1996a): Effect of epidermal growth factor (EGF) on protein neosynthesis and developmental competence of calf oocytes. En: *Proceedings 13<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction*, Sydney, Vol. 1, p. 10-10.
- Khatir H, Lonergan P, Carolan C y Mermillod P (1996b): Prepubertal calf oocytes as a negative model in the study of bovine oocyte cytoplasmic maturation. En: *Proceedings 12th Meeting European Embryo Transfer Association*, Lyon, p. 152.
- Khatir H, Lonergan P, Carolan C y Mermillod P (1996c): Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol Reprod Dev* **45**: 231-239.
- KhatirH, Lonergan P y Mermillod P (1997): Kinetics of in vitro maturation of prepubertal and adult bovine oocytes and its effect on the subsequent developmental competence. En: *Proceedings 13th Meeting European Embryo Transfer Association*, Lyon, p. 164
- Khurana NK y Niemann H (2000): Effects of quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* **54**: 741-756.
- Kim NH, Chung KS y Day BN (1997): The distribution and requirements of microtubules and microfilaments during fertilization and parthenogenesis in pig oocytes. *J Reprod Fertil* **111**: 143-149.
- Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M y Fukui Y (2001): Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* **122**: 131-138.
- Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM (2005): Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* **72**: 201-207.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A y Watanabe T (2004): Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro development ability, production of reactive oxygen species (ROS), and

- DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62:1186-1197.
- Kleinsmith LJ y Kish VM (1988): Principles of cell biology. New York: Harper and Row, 1988;796.
- Klug WS (1986): Cummings MR. Mitosis and Meiosis: transmission of genetic information. En: Cummings MR (ed), Concepts of genetics, 2nd edition. Illinois: Scott,Foresman, 1986;12-34.
- Knecht M y Catt KJ (1983): Modulation of cAMP-mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 258: 2789-2794.
- Kobayashi K, Yamashita S y Hoshi H (1994): Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* 100: 439-446.
- Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK y King WA (2003): Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 77: 33-49.
- Kotsuji F, Kubo M y Tominaga T (1994): Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *J Reprod Fert* 100:151-156.
- Krisher RL (2004): The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82(Suppl. E.): 14-23.
- Krisher RL y Bavister BD (1999): Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in vitro is associated with increased developmental competence. *Mol Reprod Dev* 53:19-26
- Krisher RL, Lane M y Bavister BD (1999): Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* 60: 1345-1352.
- Kruip ThAM y Dieleman SJ (1982): Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod Nutr Dev* 22: 465-73.
- Kruip TAM y den Daas JHG (1997): In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47
- Kubota C. y Yang X (1998): Cytoplasmic incompetence results in poor development of bovine oocytes derived from small follicles. *Theriogenology* 49: 183.
- Kuleshova LL, Macfarlane DR, Trounson AO y Shaw JM (1999): Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38: 119-30.
- Kumar J, Osborn JC, Cameron AWN, Batt PA y Trounson AO (1990): Premature condensation of chromatin induced in goat (*Capra hircus*) oocytes after gonadotrophin treatment. *Reprod Fétil Dev* 1990; 2: 661-670
- Kuran M, Robinson JJ, Staines ME, McEvoy TG (2001): Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced in vitro in different culture systems. *Theriogenology* 55: 593-606.
- ## L
- Lafleur MV, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ y Retel J (1994): The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic Res* 21 :9-17.
- Lambert RD, Sirard MA, Bernard C y Beland R (1984): The fertilization performance of bovine and rabbit spermatozoa capacitated in vitro. En: Proc. 10th Intern. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem., Illinois, USA, 3: 292.
- Lane M (2001): Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology* 55, 225-236.
- Lane M y Gardner DK (2003): Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 69: 1109-1117.
- Lane M, Gardner DK, Hasler MJ y Hasler JF(2003a): Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture:

- equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 60:407-419.
- Lane M, Maybach JM, Hooper K, Hasler JF y Gardner DK (2003b): Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol Reprod Dev* 64:70-78.
- Laurincik J, Hyttel P, Baran V, Schmoll F, Niemann H, Brem G y Schellander K (1996): Corona radiata density as a non-invasive marker of bovine cumulus-corona-oocyte complexes selected for in vitro embryo production. *Theriogenology* 46: 369-377
- Lawrence JL, Payton RR, Godkin JD, Saxton AM, Schrick FN y Edwards JL (2004): Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J Dairy Sci* 87: 2449-2454
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H y Galli C (2002): Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 67: 767-775.
- Lechniak D, Kaczmarek D, Stanislawski D y Adamowicz T (2002): The ploidy of in vitro matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology* 57: 1303-1308.
- Lee AS, Bell J y Ting J (1984): Biochemical characterization of the 94- and 78-kilodalton glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. *J Biol Chem* 259:4616-4621.
- Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Lee H, Kim MK y Roh S (1997): The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos *Hum Reprod* 12(11): 2493-2498
- Leese HJ (1995): Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update* 1:63-72.
- Leese HJ y Lenton EA (1990): Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. *Hum Reprod* 5: 915-919.
- Lefèvre B, Nagyova E, Pesty A y Testart J (1997): Acquisition of meiotic competence is related to the functionality of the phosphoinositide/calcium signaling pathway in the mouse oocyte. *Exp Cell Res* 236: 193-200.
- Leibfried ML y First NL (1980): Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. *Biol Reprod* 23: 699-704.
- Leibfried ML y Bavister BD (1982): Effects of epinephrine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *J Reprod Fert* 66: 87-93.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES y First NL (1986): Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. *Biol Reprod* 35: 850-857.
- Lengwinat T, Blotter S, Wesuhn A y Pitra C (1990): A comparison of the pregnancy rate, using fresh or frozen bull semen, after in vitro maturation and fertilization of non-ovulated cattle oocytes. *Monatshfte fur Veterinarmedizin* 45: 345-347.
- Leoni GG, Rosati I, Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S y Naitana S (2007): A Low Oxygen Atmosphere during IVF Accelerates the Kinetic of Formation of in vitro Produced Ovine Blastocysts *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111/j.1439-0531.(2006):.00783.x
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I (2003): Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod* 69: 1707-1713.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ y de Kruif A (2004): Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 80: 201-211.
- Levesque JT y Sirard MA (1994): Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. *Reprod Nutr Dev* 34: 133-139
- Lévesque JT y Sirard MA (1995): Effects of different kinases and phosphatases on



- nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *Mol Reprod Dev* 42: 114–121
- Levesque JT y Sirard MA (1996): Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55: 1427-1436.
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT y Gilchrist RB (2000): Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod* 63: 839–845.
- Liebfried ML y First NL (1979): Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 48:76-86.
- Lim JM, Reggio BC, Godke RA y Hansel W (1999): Development of in vitro- derived bovine embryos cultured in 5% CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>,5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. *Hum Reprod* 14: 458–464.
- Lim KT, LeeBC, Kang SK y Hwang WS (2003): Effects of protein source and energy substrates on the in vitro development of bovine embryos in a two-step culture system. *J Vet Sci* 4 (1): 73–78 .
- LindnerHR, Tsafiriri A, Lieberman E, Zor U, Koch Y, Bauminger S y Barnea A (1974): Gonadotropin action on cultured graafian follicles: induction of maturation division of luteal cells. *Recent Prog Horm Res* 30: 79–138.
- Liu H y Aoki F (2002): Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. *Zygote* 10: 327–332.
- Liu J, Van Der Elst J y Dhont M (2003): In vitro parthenogenetic development of mouse oocytes following reciprocal transfer of the chromosome spindle between in vivo-matured oocytes and in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod* 68: 186–189.
- Lonergan P, Carolan C y Mermillod P (1994a): Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reprod Nutr Dev* 34: 329–339.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP y Gordon I (1994b): Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Develop* 37: 48–53.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H y Mermillod P (1996): Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 54: 1420–1429.
- Lonergan P, Khatir H, Carolan C y Mermillod P (1997): Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil* 109:355-365
- Lonergan P, O'Kearney-Flynn M y Boland MP (1999): Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology* 51: 1565-1576.
- Lonergan P, Rizos D, Ward F y Boland MP (2001): Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev* 41:427-437.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T y Boland MP (2003): Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim* 38: 259-267.
- Long CR, Damiani P, Pinto-Correia C, MacLean RA, Duby RT y Robl JM (1994): Morphology and subsequent development in culture of bovine oocyte matured in vitro under various conditions of fertilization. *J Reprod Fertil* 102:361-369.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL y Johnson DL (1994): Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41:67-72.
- Lopez L, Alvarez N, Nunez I, Montes I, Solano R, Fuentes D, de Armas R, Palma GA y Brem G (1996a): The influence of body condition on the ovarian morphology and quality of bovine oocytes for in vitro production of embryos. In: *Proceedings 13th International Congress on Animal Reproduction*, Sydney, Vol. 1: 10–15.

- Lopez L, Alvarez N, Nunez I, Montes I, Solano R, Fuentes D, Pedroso R, Palma GA y Brem G (1996b): Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 292.
  - López-Gatius F (2003): Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 60: 89–99.
  - Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC y Illera M (1994): Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil* 101: 697–701
  - Lu K y Gordon I (1988): Effect of heparin on the capacitation of frozen-thawed bovine spermatozoa used in the in vitro fertilization (IVF) of oocytes matured in vitro. En: 11<sup>th</sup> Int Congr Anim Reprod AI 3:339-341.
  - Lu KH y Seidel Jr GE (2004): Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.
  - Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanese E, Lauria A y Gandolfi F (2004): Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. *Biol Reprod* 70: 465–472.
  - Ludwig H, Homuth G, Schmalisch M, Dyka FM, Hecker M y Stülke J (2001): Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the gapA operon. *Mol Microbiol* 41: 409–422.
- M**
- Machatkova M, Jokesova E, Petelikova J y Dvoracek V (1996): Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 45: 801–10.
  - Machatkova M, Krausova K, Jokesova E y Tomanek M (2004): Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61:329–335.
  - Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Reckova Z y Hulinska P (2006): Collection of oocytes from donors in the growth phase of follicular development can enhance the production of bovine embryos for cryopreservation. *Vet Med* 51: 232–238
  - Madison V, Avery B y Greve T (1992): Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim Reprod Sci* 27: 1–11
  - Majerus V, Le Gal F, De Roover R, Donnay I, Massip A y Dessy F (1999): Maturation competence is related to prepubertal calves oocyte diameter. *Theriogenology* 51: 385
  - Manova K, De Leon V y Angeles M (1995): mRNAs for activin receptors II and IIB are expressed in mouse oocytes and in the epiblast of pregastrula and gastrula stage mouse embryos. *Mech Dev* 49: 3-11.
  - Marston JH y Chang MC (1964): The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *J Exp Zool* 15: 237–51.
  - Martins A, Keskinetepe L y Brackett BG (1998): Use of recombinant gonadotrophins for bovine embryo production in vitro. *Theriogenology* 49: 292.
  - Massip A, Mermillod P y Dinnyes A (1995): Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryo- preservation. *Human Reprod* 10: 3004–3011.
  - Masui Y y Clarke HJ (1979): Oocyte maturation. *Int. Rev Cytol* 57: 185–282.
  - Mastroianni LJ y Jones R (1965): Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil* 9:99-102.
  - Mastromonaco GF, Semple E, Robert C, Rho GJ, Betts DH y King WA (2004): Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reprod Domest Anim* 39:462–467.

- Masui Y (1990): The cytostatic factor (CSF) that causes metaphase arrest in amphibian eggs. En: Dale Nato B (ed), Mechanism of fertilization, 35-44.
- Matsui Y (1998): Regulation of germ cell death in mammalian gonads. *Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica* 106:142-148.
- Mattioli M (1994): Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote* 2: 347-349.
- Mattioli M y Barboni B (2000): Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol Cell Endocrinol* 161: 19-23
- Mattioli M, Galeati G, Baci ML y Seren E (1988): Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular co-operation between cumulus cells and oocytes. *Gamete Res* 21: 223-232.
- Matton P, Adelakoun V, Couture Y y Dufour JJ (1981): Growth and replacement of bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J Anim Sci* 37:48-53
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM y Eppig JJ (2002): Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296: 2178-2180.
- May JV y Schomberg DW (1989): The potential relevance of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  to ovarian physiology. *Semin Reprod Endocrinol* 7:1-11.
- McEvoy TG (1999): Oocyte and embryo competence: keys to cattle fertility. *Cattle Practice* 7: 401-408.
- McEvoy TG (2003): Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod Dom Anim* 38: 268-275.
- McEvoy TG y Robinson JJ (2002): Nutrition of the dam and growth of the foetus. En: Maillard, R. (ed.) *Gestation. Société Française de Buiatrie*, Paris, pp. 159-169
- McGaughey RW (1977): The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17 $\beta$  on meiotic maturation. *Endocrinology* 100: 39-45.
- McKiernan SH y Bavister BD (1992): Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. *In Vitro Cell Dev Biol* 28: 154-156
- McNatty KP (1978): Follicular Fluid. En: Jones RE, editor. *The vertebrate ovary*. New York and London: Plenum Press. P 215-259
- McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, Smith P, Groome NP y Laitinen M (2004): The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128: 379-386.
- McNatty KP, Heath DA, Henderson KM, Lun S, Hurst PR, Ellis LM, Montgomery GW, Morrison L y Thurley DC (1984): Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 72: 39-53.
- Mermillod P y Saumande J (1992): Developmental competence of oocytes from small follicles of prepubertal slaughtered calves. V Colloque Franco-Tchécoslovaque sur la Reproduction des Animaux Domestiques, Jouy-en-Josas, France 1992; p. 15
- Mermillod P, Oussaid B y Cognie Y (1999): Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 54:449-60.
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM y Dieleman SJ (2003): Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651-74.
- Mikkelsen AL, Smith S y Lindenberg S (2000): Possible factors affecting the development of oocytes in in vitro maturation. *Hum Reprod* 15 (Suppl. 5): 11-17.
- Miller DJ, Winer MA y Ax RL (1990): Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 42:899.
- Miller GF, Gliedt DL, Lester TD, Pierson JM, Rakes JM y Rorie RW (1992): Addition of

- bovine epithelial cells (BOE C) and/or penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) to bovine in vitro fertilization (IVF) medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 37: 259.
- Miller GF, Gliedt DW, Rakes JM y Rorie RW (1994): Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 41: 689–696.
- Mingoti GZ, Caiado Castro VS, Méo SC, Barretto LY y Garcia JM (2009): The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. *Zygote* 17(4):321-8.
- Modina S, Luciano AM, Scesi L, Perazzoli F, Lauria A y Gandolfi F (2000): Recombinant FSH stimulates developmental competence of bovine oocytes and B-catenin can be used as an early marker of normal embryonic development. In: *Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm, 2–6 July, p. 148.
- Momozawa K y Fukuda Y (1995): In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes with heterogeneous ooplasm. *Anim Sci Tech* 66: 605–609.
- Monson R, Northey DL, Gottfredson R, Peschel DR, Rutledge J y Schaefer DM (1992): Pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos following nonsurgical transfer. *Theriogenology* 37:261 (abstract).
- Moor K (1983): Contact, signalling and cooperation between follicle cells and dyctate oocytes in mammals. En *Current problems in cell line differentiation*. McLaren A y Wylie CC (eds). Symposium of British Society for Developmental Biology. Cambridge University Press. 307-326.
- Moor RM y Trounson AO (1977): Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fert* 49,101-109.
- Moor RM y Gandolfi F (1987): Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J Reprod Fert* 34: 55-69.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J y Nagai T (1990): Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 40:197–210.
- Moor RM, Osborn JC, Cran DG y Walters DE (1981): Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. *J Embryol Exp Morphol* 61: 347-365.
- Moor RM, Osborn JC y Crosby IM (1985): Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fert* 74: 167-172.
- Moore K, Rodriguez-Sallaberry CJ, Kramer JM, Johnson S, Wroclawska E, Goicoa S y Niasari-Naslaji A (2007): In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology* 68: 1316–25.
- Motlik J y Fulk J (1986): Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25: 87–96.

## N

- Nagano M, Takahashi Y y Katagiri S (1999): In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J Vet Med Sci* 61: 531–535.
- Nagano M, Katagiri S y Takahashi Y (2006): Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote* 14: 53–61.
- Nass SJ, Miller DJ, Winer MA y Ax RL (1990): Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to caudal epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol Reprod Dev* 25: 237.
- Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC y Yang X (2004): Comparison on in vitro-fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.

- Nedambale TL, Du F, Yang X y Tian XC. (2006): Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Anim Reprod Sci* 93: 61-75.
- Nekola MV y Nalbandov AV (1971): Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. *Biol Reprod* 4:154–160.
- Niemann H y Wrenzycki C (2000): Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53: 21–34.
- Niwa K., Park CK y Okuda K (1991): Penetration in vitro of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. *J Reprod Fertil* 91: 329–336
- Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT, Lonergan P y Boland MP (1998): The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50:1263–1274.
- Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B y Heyman Y (2004): Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus–oocyte complexes during oocyte maturation. *Domest Anim Endocrinol* 27: 179–195.
- O**
- O'Donnell JB, Hill JL y Gross DJ (2004): Epidermal growth factor activates cytosolic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevations and subsequent membrane permeabilization in mouse cumulus–oocyte complexes. *Reproduction* 127: 207–220.
- Ocana-Quero JM, Pinedo-Merlin M y Moreno-Millan M (1999): Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 51 (3): 667–672.
- Okuda Y, Okamura H, Kanzaki H, Takenaka A, Morimoto K y Nishimura T (1982): An ultrastructural study of capillary permeability of rabbit ovarian follicles using horseradish peroxidase as a tracer. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 34: 181–186.
- Olson SE y Seidel Jr GE (2000b): Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *J Anim Sci* 78:152-157.
- Olson SE y Seidel Jr GE (2000a): Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 62.
- Orsi NM y Leese HJ (2004): Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology* 61: 561–572.
- Osborn JC y Moor RM (1983): The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. *J Steroid Biochem* 19:133-137.
- Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF y Shimasaki S (2001): Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 276: 11387-11392
- Oyamada T y Fukui Y (2004): Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev* 50: 107-117.
- Ozawa M, Tabayashi D, Latief, TA, Shimizu T, Oshima I y Kanai, Y (2005): Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction* 129: 621–630.
- P-Q**
- Palasz AT, Thundathil J, Verrall RE, Mapletoft RJ (2000): The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Anim Reprod Sci* 58, 229-240.
- Palasz AT, Beltran BJ, De la Fuente P, Martinez MF, Gutierrez-Adan A. (2006):

- The effect of amino acids and hyaluronan on bovine embryo development and gene expression pattern. *Reprod Fertil Dev* 18:194-194.
- Palma GA, Tortonese DJ y Sinowatz F (2001): Developmental capacity in vitro of prepubertal oocytes. *Anat Histol Embryol* 30: 295-300.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC y Conti M (2004): EGF-Like Growth Factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303: 682-684.
- Park J, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM y Lee ES (2005): High oxygen tension during in vitro oocyte maturation improves in vitro development of porcine oocytes after fertilization. *Anim Reprod Sci* 87: 133-141.
- Park Y, Kim S, Kim J, Park H y Byun M (2005): The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* 64: 123-134.
- Park YS y Lin YC (1993): Effect of epidermal growth factor (EGF) and defined simple media on in vitro bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 39: 475-484.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH y First NL (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591- 600.
- Parrish J, Susko-Parrish M, Winer y First L (1988): Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38: 1171-1180.
- Parrish J, Susko-Parrish JL y First NL (1989): Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41:683-699.
- Parrish JJ (1991): Application of in vitro fertilization to domestic animal. En: *The Biology and Chemistry of Mammalian Fertilization*. Vol II. (Ed PM Wassarman); pp. 111-132, CRC Press, New York.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ y Agarwal A (2000): Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 73: 459-64.
- Paula-Lopes FF, De Moraes ASS, Edwards JL, Hansen PJ (1998): Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1. *Biol Reprod* 59: 1406-1412.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A y Niemann H (1992): Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 31: 63-7.
- Pavlok A, Kaláb P y Bobák P (1997): Fertilisation competence of bovine normally matured or aged oocytes derived from different antral follicles: morphology, protein synthesis, H1 and MBP kinase activity. *Zygote* 5: 235-246.
- Pavlok A (2000): D-penicillamine and granulosa cells can effectively extend the fertile life span of bovine frozen-thawed spermatozoa in vitro: effect on fertilization and polyspermy. *Theriogenology* 53: 1135-1146
- Perrault SD, Wolff y Zirkin BR (1984): The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 101: 160.
- Perrault SD, Barbee RR y Slott VL (1988): Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocyte. *Dev Biol* 125: 181.
- Peterson AJ y Lee RS (2003): Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 59: 687-697.
- Petr J, Zetova L, Fulka J y Jilek F (1989): Quantitative inhibitory influence of porcine cumulus cells upon the maturation of pig and cattle oocytes in vitro. *Reprod Nutr Dev* 29 5:541-549.
- Picton H, Briggs D y Gosden R (1998): The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 145: 27-37.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM y Taverne MAM (1988): Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal

- ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751-762.
- Pincus G y Enzmann EV (1935): The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J Exp Med* 62: 665-675.
- Pinyopummintr T y Bavister BD (1991): In vitro- matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein- free culture media. *Biol Reprod* 45:736-742.
- Pinyopummintr T y Bavister BD (1995): Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44:471-477
- Pinyopummintr T y Bavister BD (1996): Effects of amino acids on development in vitro of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 8: 835-841.
- Plachot M y Mandelbaum J (1990): Oocytes maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *British Medical Bulletin* 46(3): 675-694.
- Pollard JW, Martino A, Rumph ND, Songsasen N, Plante C y Leibo SP (1996): Effect of ambient temperatures during oocyte recovery on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 46:849-858.
- Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T y Aguilar B (2005): Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study, *Theriogenology* 63:2254–2268
- Preis K, Seidel G y Gardner D (2007): Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 74: 893-903.
- Presicce GA, Jiang S, Simkin M y Yang X (1996): Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves. *Biol Reprod* 52 (suppl. 1), 127.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad CE Jr, Hammer RE y Brinster RL (1985): A rapid whole-mount staining products for nuclei of mammalian eggs. *Theriogenology* 24: 687-691
- Quinn P y Wale R (1973): The relationship between the ATP content of preimplantation mouse embryos and their development in vitro during culture. *J Reprod Fertil* 35:301-309.
- ## R
- Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG y Scaramuzzi RJ (1997): An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous differences methods in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 48: 9–25.
- Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG (1999): Relationships among metabolites influencing ovarian function in the dairy cow. *J Dairy Sci* 82: 39–44.
- Racowsky C (1991): Gamete Resources: Origin and production of oocytes. En: *Animal Applications of Research in Mammalian Development* (1991): Pp 23-82.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP y Heyman Y (1993): In vitro production of blastocysts from calf oocytes. 9e Réunion AETE, Lyon 1993; 270
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP y Heyman Y (1995): Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fert* 103: 115-120.
- Richard F, Sirard MA (1993): The effect of coculture of follicular components with bovine oocytes on meiotic resumption. *Biol Reprod* 48 (suppl 1) 123
- Richard FJ y Sirard MA (1996): Effects of follicular cells on oocyte maturation. II. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 54: 22–28.
- Richter JD y McGaughey RW (1979): Specificity of inhibition by steroids of porcine oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 209:81-90.
- Rieger D y Loskutoff NM (1994): Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fert* 100(1): 257-262.

- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A y Gandolfi F (1998): The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 112: 123–130.
- Rinaudo P y Schultz R (2004): Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction* 128: 301–311.
- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP y Lonergan P (2002a): Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 62: 320–327.
- Rizos D, Lonergan P, Ward F, Duffy P, Boland MP y Lonergan P (2002b): Consequences of bovine maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61: 234–248.
- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP y Lonergan P (2003): Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68:236–243.
- Robertson I y Nelson RE (1998): Certificación y identificación de embriones. En: Stringfellow DA y Seidel SM (Eds.). *Manual de la International Embryo Transfer Society*. IETS, Savoy, IL, USA, pp. 109–122
- Rodriguez H, Torres C, Valdes X, Guerra H, Pastor LM, Maccallini G y Bustos-Obregon E (2001): The acrosomic reaction in stallion spermatozoa: inductive effect of the mare preovulatory follicular fluid. *Biocell* 25: 115–120.
- Roeder GS (1990): Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. *Trends in Genetics* 6:385–389.
- Romero-Arredondo A y Seidel GEJ (1996): Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biol Reprod* 55: 1012–1016.
- Rondell P (1970): Biophysical aspects of ovulation. *Biol Reprod (Suppl)* 2:64–89.
- Rose TA y Bavister BD (1992): Effect of oocyte maturation medium in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 31:72–77.
- Rose-Hellekant TA, Libersky-Weilliamson EA y Bavister BD (1998): Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 6: 285–294
- Rosenkrans CF y First NL (1991): Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 35, 266.
- Rosenkrans CF Jr y First NL (1994): Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci* 72:434.
- Roth Z y Hansen PJ (2004a): Involvement of apoptosis in disruption of oocyte competence by heat shock in cattle. *Biol Reprod* 71, 1898–1906.
- Roth Z y Hansen PJ (2004b): Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol Reprod* 71: 2072–2078.
- Roth Z y Hansen PJ (2005): Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129: 235–244.
- Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R y Wolfenson D (2000): Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fertil* 120: 83–90.
- Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R y Wolfenson D (2001a): Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121: 745–751.
- Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R y Wolfenson D (2001b): Improvement of



quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 122: 737–744.

Roth Z, Aroyo A, Yavin S y Arav A (2008): The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle enclosed oocytes in mice. *Theriogenology* 70: 887–897.

Ruibal S, Quintela LA, Peña AI, Becerra JJ y Herradón PG. (2006): Defining bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Anim* 41: 108.

Russe I (1983): Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica* 24: 77-92.

## S

Saeki K, Hoshi M, Liebfried-Rutledge ML y First NL (1991): In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 44: 256-260.

Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ y Memili E (2007): Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim Reprod Sci* 101:225-240.

Sakaguchi M, Dominkop T, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T y First NL (2000): A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology* 54: 1327–1342.

Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T y First NL (2002): Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction* 123: 135–142

Saleh RA, Agarwal A (2002): Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 23:737–752.

Salustri A, Yanagishita M y Hascall VC (1989): Synthesis and accumulation of

hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem* 264: 13840-13847.

Salustri A, Ulisse S, Yanagishita M y Hascall VC (1990a): Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 265:19517–19523.

Salustri A, Yanagishita M y Hascall VC (1990b): Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol* 138:26–32.

Sanbuissho A y Threlfall WR (1989): The effects of oestrus cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 31: 693-699.

Santl B, Wenigerkind H, Schernthaner W, Modl J, Stojkovic M, Prella K, Holtz W, Brem G y Wolf E (1998): "Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers." *Theriogenology* 50(1): 89-100.

Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish J J y Wiltbank M C (2002): Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 85, 2803–2812.

Sato E, Matsuo M y Miyamoto H (1990): Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 1. *J Anim Sci* 68: 1182–7.

Schats R, Sutter PD, Bassil S, Kremer JA, Tournaye H y Donnez J (2000): Ovarian stimulation during assisted reproduction treatment: a comparison of recombinant and highly purified urinary human FSH. On behalf of The Feronia and Apis study group. *Hum Reprod* 15:1691-1697

Schuetz AW y Anisowicz A (1974): Cation and protein composition of ovarian follicular fluid of the pig: relation to follicle size. *Biol Reprod* 11: 64-72.

- Semenza GL, Wang GL (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 5447-5454.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM y Wang GL (1994): Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757-23763.
- Sendag S, Cetin Y, Alan M, Hadelér KG y Niemann H (2008): Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 106(1-2), 208-214.
- Seneda MM, Esper CR, García JM y Vantini R. (2000): Effect of follicle diameter on recovery, quality and developmental competence of oocytes obtained in vivo. In: *Proceedings 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm, Vol. 1, p. 62.
- Sharma RK y Agarwal A (1996): Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48:835-50.
- Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y (2000): Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol Reprod Dev* 56:306-308
- Shen PC y Lee SN (1999): The effect of ovary presence or absence of a large dominant follicle on the development of in vitro produced oocytes which were aspirated from small antral follicles in Taiwan native yellow cattle. *Journal of the Chinese Society of Animal Science* 28: 461-470.
- Shi DS (1991): Studies related to factors affecting the yield of bovine embryos produced by in vitro techniques. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin
- Shi DS, Avery B y Greve T (1998): Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 50: 667-674.
- Shimada M, Maeda T y Terada T (2001): Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes, *Biol Reprod* 64 4:1255-1263.
- Shimada M y Terada T (2002): FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes, *Mol. Hum Reprod* 87:612-618.
- Shimada M, Ito J, Yamashita Y, Okazaki, T y Ito N (2003): Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes, *J Endocrinol* 179 1: 25-34.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M y Iwasaki S (1988): In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* 30: 489-496.
- Sikka SC (2004): Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 25:5-18.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E y Paul DL (1997): Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, 385:525-529.
- Sinclair KD, Kuran M, Sorohan P, Staines ME y McEvoy TG (1999): Dietary nitrogen metabolism, folliculogenesis and IVP in cattle. *Theriogenology* 51: 309.
- Sinclair KD, Kuran M, Staines ME, Aubailly S, Mackie K., Robinson JJ Webb R y McEvoy TG (2000): In vitro blastocyst production following exposure of heifers to excess rumen degradable nitrogen during either the preantral or antral stages of follicular growth. *Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series* 25: 41.
- Sinclair KD, Rooke JA y McEvoy TG (2003): Regulation of nutrient uptake and metabolism in pre-elongation ruminant embryos. *Reproduction Suppl*, 61: 371-385.
- Singh B, Barbe CT y Armstrong DT (1993): Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocytes-cumulus

- cell complexes in vitro. *Mol Reprod Dev* 36:113-119.
- Sirard MA y First NL (1988): In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod* 39: 229-34.
- Sirard MA y Blondin, P (1996): Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42: 417-426.
- Sirard MA, Parrish L, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML y First NL (1988): The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 39:546-552.
- Sirard MA, Florman HP, Leibfried-Rutledge ML, Barnes PL Sims ML y First NL (1989): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40: 1257-1263.
- Sirard MA, Coenen K y Bilodeau S (1992): Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 37: 39-57.
- Sirard MA, Richard FJ y Mayes M (1998): Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review, *Theriogenology* 49: 483-497.
- Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L y Robert C (2003): The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl* 61:117-129.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P y Robert C. (2006): Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ y Brackett BG (2003): Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim Reprod Sci*, 77:21-32.
- Slimane W, Heyman Y, Lavergne Y, Humbolt P y Renard JP (2000): Assessing chromosomal abnormalities in 2-cell bovine in vitro- fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol Reprod* 62:628- 635.
- Slotte H, Gustafson O, Nylund L y Pousette A. (1990): ATP and ADP content of human pre-embryos. *Hum Reprod* 5:319-322.
- Snijders SEM, Dillon P, O'Callaghan D y Boland MP (2000): Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53: 981-989
- Son WY, Han SY, Son JO, Park EH, Lee KA, Ko JJ y Cha KY (1997): Direct positive effect of EGF on nuclear maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 12: 39.
- Son WY, Lee SY y Lim JH (2005): Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles. *Hum Reprod* 20:3204-3207.
- Soto P y Smith LC (2009): BH4 peptide derived from BclxL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 76: 637-646.
- Spicer LJ, Echternkamp SE, Canning SF y Hammond JM (1988): Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biol Reprod* 39:573-580.
- Staigmiller RB y Moor RM (1984): Effecto of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Research* 9:221.
- Stallcup OT (1970) Enzyme activity of bovine follicular fluid. *J Dairy Sci* 53:382 (Abstr).
- St-Arnaud R, Walker P, Kelly PA y LaBrie F (1983): Rat ovarian epidermal growth factor receptors: characterization and hormonal regulation. *Mol Cell Endocrinol* 31:43-52.
- Staton PG, Burgon PG, Hearn MTW y Robertson DM (1996): Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Molec Cell Endocrinol* 125:133-141.
- Steenweg WNM, Vos PLAM, Henriksen PJM, Bevers MM, Merton S y Dieleman SJ (2000): Collection of oocytes by ovum

- pick-up during defined stages of a follicular wave and subsequent developmental competence. *Theriogenology* 53: 384
  - Steeves TE y Gardner DK (1999b): Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol. Reprod* 61: 731-740.
  - Steeves TE y Gardner DK (1999a): Metabolism of glucose, pyruvate and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Mol Reprod Dev* 54: 92-101
  - Steeves TE, Gardner DK, Zuelke KA, Squires TS y Fry RC (1999): In vitro development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of prepubertal and adult cows. *Mol Reprod Dev* 54: 49-56.
  - Stevenson, J. S. (2001): Reproductive management of dairy cows in high milk-producing herds. *J Dairy Sci* 84 (Suppl. E), E128-E143.
  - Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB y Wolf E (2001): Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 64: 904-909
  - Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F y Wolf E.(2002): Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 124: 141-153.
  - Sugiura K y Eppig JJ (2005): Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2005. *Reprod Fertil Dev* 17: 667-674.
  - Sun FZ y Moor RM (1991): Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. *Development* 111: 171-180.
  - Susko-Parrish JL, Wheeler MB, Ax RL, First NL y Parrish JJ (1990): The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite on bovine in vitro fertilization *Theriogenology* 33 :333
  - Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB y Thompson JG (2003a): Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* 126: 27-34.
  - Sutton ML, Gilchrist RB y Thompson JG (2003b) Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 9: 35-48
  - Sutton ML, Gilchrist RB y Thompson JG (2010): The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139: 685-695.
  - Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB y Thompson JG (2004): Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction*. 128: 313-319.
- ## T
- Tajik P, Niwa K y Murase T (1993): Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenology* 40: 949-958.
  - Takahashi Y y First NL (1992): In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963
  - Talbot P, Shur BD y Myles DG (2003): Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 68: 1-9.
  - Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D y Tripp MW (2000): Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 62: 206-213.
  - Tervit H, Whittingham D y Rowson L (1972): Successful culture of in vitro of sheep

- and cattle ova. *J Reprod Fertil* **89**: 573-578.
- Thibault C, Szöllösi D y Gerard M (1987): Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Develop* **27**: 865-896
- Thibier M (2004): Data Retrieval Committee Report. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increase of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. *Embryo Transfert Newsletter* **22**: 12-19.
- Thomas RE, Armstrong DT y Gilchrist RB (2004): Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* **70**: 548-56
- Thompson JG (2000): In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Anim Reprod Sci* **60/61**: 263-275.
- Thompson JG (2007): Culture without the petri-dish. *Theriogenology* **67**: 16-20.
- Thompson J, Simpson A, Pugh P, Donnelly PE y Tervit HR (1990): Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil* **89**: 573-578.
- Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell AC, Lambert MG y Tervit HR (1998): Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* **49**: 1239-1249
- Törnell J, Bergh C, Selleskog U y Hillensjö T (1995): Effect of recombinant human gonadotrophins on oocyte meiosis and steroidogenesis in isolated pre-ovulatory rat follicles. *Hum Reprod* **10**: 1619-1622.
- Trimarchi JR, Liu L, Portefield DM, Smith PJS y Keefe DL (2000): Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* **62**: 1866-1874.
- Trounson A, Pushet D, Maclellan LJ, Lewis I y Gardner DK (1994): Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* **41**: 57-66
- Tsafriri A (1978): Oocyte maturation in mammals. En: Jones RE (ed), *The vertebrate ovary: comparative biology and evolution*. New York: Plenum, 1978; 409-442.
- Tsang TE, Khoo PL, Jamieson RV, Zhou SX, Ang SL, Behringer R y Tam PP (2001): The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *Int J Dev Biol* **45**: 549-555.
- ## V
- Vajta G, Holm P, Greve T y Callesen H (1996): Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology* **45**: 683-689
- Van Blerkom J, Davis PD y Lee J (1995): ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* **10**: 415-424.
- Van Blerkom J, Antczak M y Schrader R (1997): The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* **12**: 1047-1055.
- Van de Leemput EE, van der Schans JM, Vos PLAM, Bevers MM y Dieleman SJ (1998): Follicular function as defined by estradiol-17-beta production determines in vitro developmental capacity of bovine oocytes derived from preovulatory-sized follicles. *Theriogenology* **49**: 300
- Van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC y Dieleman SJ (1999): Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* **52**: 335-49
- Van den Hurk R y Zhao J (2005): Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**: 1717-1751.
- van den Hurk R, Dijkstra G, van Mil FN, Hulshof SC y van den Ingh TS (1995): Distribution of the intermediate filament

- proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev* 41:459-467.
- Van den Hurk R, Abir R, Telfer EE y Bevers MM (2000): Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update* 6: 457-474
- Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, van der Schans A, Eyestone WH y de Boer H (1992): Relationship between kinetics of polar body extrusion and developmental potential of bovine oocytes. 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. The Hague 1:384-38.
- van Soom A, Bols PEJ y de Kruif A (2004): Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 80: 201-211
- van Tol HT, van Eijk MJ, Mummery CL, van der Hurk R y Bevers MM (1996): Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod Dev* 45(2):218-224.
- Van den Hurk R., Abir R, Telfer EE y Bevers MM (2000): Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update* 6: 457-474
- Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R y Eppig JJ (1990): Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol* 140:307-317.
- Vanderhyden BC, Cohen JN y Morley P (1993): Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 133: 423-426.
- Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Vanopdenbosch E y De Kruif A (1999): Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 54: 255-263.
- Vanroose G, Van Soom A y de Kruif A (2001): From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod Domest Anim* 36: 25- 28.
- Varisanga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahrudin M y Suzuki T (1998): Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. *Theriogenology* 50: 1015-1023.
- Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J y Adams GP (2003): Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60: 923-932.
- Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ y Maro B (1994): Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120: 1017-1025.
- Verlhac M-H, Kubiak JZ, Weber M, GeÅraud G, Colledge WH, Evans MJ y Maro B (1996): Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122: 815-822.
- Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P y Thomsen PD (2002): Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol Reprod Dev* 62:483-488.

## W

- Waldrop JG, Stringfellow DA, Galik PK, Riddell KP, Riddell MG, Givens MD y Carson RL (2004): Infectivity of bovine viral diarrhea virus associated with in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology* 62: 387-397.
- Wang WH, Nina K (1995): Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zygote* 3: 345-350.
- Wang H, Shao N, Ding QM, Cui J, Reddy ES y Rao VN (1997): BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with

- E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene* 15: 143–157.
- Wang WH, Aberdeera LR, Prather RS y Day BN (1998). Functional Analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. *Mol Reprod Dev* 51: 346–353
- Wang Y, Storeng R, Dale PO, Abyholm T y Tanbo T (2001): Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa in vitro. *Gynecol Endocrinol* 15: 286–292.
- Ward FA, Lonergan P, Enright BP y Boland MP (2000): Factors affecting recovery and quality of oocyte for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technologic. *Theriogenology* 54: 33–46.
- Ward FA, Enright B, Rizos D, Boland M y Lonergan P (2002): Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57: 2105–2117.
- Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT y McAllister AJ (2002): Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci* 85: 244–251.
- Wassarman PM (1988): The Mammalian Ovum. In: Neill J (ed), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltda., 69.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J y Westhusin ME (2000): Impact of bovine maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod* 62: 355–364.
- Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK y Hunter MG (2007): Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 68:22–29.
- Wehrman ME, Welsh TH, Williams GL (1991): Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. *Biol Reprod* 45: 514–522.
- Wei Z, Cao Y, Cong L, Zhou P, Zhang Z y Li J (2008): Effect of metformin pretreatment on pregnancy outcome of in vitro matured oocytes retrieved from women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 90:1149–1154.
- Weimer PJ, Shi Y y Odt CL (1991): A segmented gas–liquid delivery system for continuous culture of microorganisms on insoluble substrates and its use for growth of *Ruminococcus flavefaciens* on cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 36 (2): 178–183.
- Wenger RH y Gassmann M (1997): Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378: 609–616
- Westergaard LG, Andersen CY (1991): Epidermal growth factor in human ovarian follicular fluid. En: Haseltine FP, Findlay JK (eds.), *Growth Factors in Fertility Regulation*. Cambridge: Cambridge University Press; 1991: 261–269.
- Wheeler MB, Clark SG y Beebe DJ (2004): Developments in in vitro technologies for swine embryo production. *Reprod Fertil Dev* 16: 15–25.
- Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA y Hull MG (1999): Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int J Androl* 22: 236–42
- Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y y Meidan R (1997): Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci* 47:9–19.
- Wolfsdorf KE, Díaz T, Schmitt EJP, Thatcher MJ y Drost M (1997): The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology* 48:435–447.
- Wood SA y Kaye PL (1989): Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil* 85:575–582 .
- Wrenzycki C., De Sousa P, Herrmann D, Watson AJ, Niemann H, O’Callaghan D y Boland MP (1999): Effect of diet type and quantity fed during superovulation on the relative abundance of mRNA in bovine embryos. *Theriogenology* 51: 195.

- Wrenzycki C, De Sousa P, Overstrom EW, Duby RT, Herrmann D, Watson AJ, Niemann H, O'Callaghan D y Boland MP (2000a): Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. *J Reprod Fertil* **118**: 69–78.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Keskintepe L, Martins A Jr, Sirisathien S, Brackett B y Niemann H (2001): Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* **16**:893–901.
- Wrenzycki C, Herrman D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E y Niemann H (2005): Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* **17**:23–35.
- Wright RJ Jr y Bondioli KR (1981): Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* **53**: 702–29.
- Wu T, Wang L y Wan Y (1992): Expression of estrogen-receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. *Mol Reprod Dev* **33**:407–412.
- Wurth YA y Kruip TAM (1992): Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. En: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction*. The Hague. The Netherlands **1**:387–9.
- X-Y**
- Xu KP, Greve T, Smith S y Hyttel P (1986): Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet Scand* **27**: 505–19.
- Xu KP y Greve T (1988): A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fert* **82**:127–134.
- Yaakub H, O'Callaghan D y Boland MP (1999a): Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilization and development of oocytes recovered from beef heifers. *Anim Reprod Sci* **55**, 1–12.
- Yaakub H, O'Callaghan D y Boland MP (1999b): Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* **51**, 1259–1266.
- Yamashita Y, Shimada M, Okazaki T, Maeda, T y Terada T (2003): Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol Reprod* **68**(4):1193–1198.
- Yanagimachi R (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. En *Fertilization and Embryonic Development in Vitro*, pp. 81–182. Eds L. Mastroianni, Jr y
- Yang BS, Im GS y Park SJ (2001): Characteristics of Korean native, Hanwoo, calves produced by transfer of in vitro produced embryos. *Anim Reprod Sci* **67**: 153–158.
- Yong-Soo P, So-Seob K, Jae-Myeoung K, Hum-Dai P y Myung-Dae B. (2005): The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* **64**:123–134.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba y, Kojima Y (1992): Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fertil* **95**: 481–488.
- Young E, Gullierez CG, Butterwith SG, Robison JJ, Broadbent PJ y McEvoy TG (1999): Altered IGF binding protein expression is associated with large offspring syndrome in fetal sheep. *Theriogenology* **51**:196
- Young LE, Sinclair KD y Wilmut I (1998): Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* **3**:155–163.
- Younis AI y Brackett BG (1991): Importance of cumulus cells and insemination interval for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts in vitro. *Theriogenology* **36**: 11–21.
- Younis AI, Brackett BG y Fayrer-Hosken RA (1989): Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research* **23**:189–201.



Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FO, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, De Kruif A y Peelman LJ (2003): Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 59: 1585-1596.

## Z

Zachariae F y Jensen CE (1958): Studies on the mechanism of ovulation: Histochemical and physico-chemical investigations on genuine follicular fluids. *Acta Endocr* 27:343.

Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D y Arav A (2001): Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121: 447-454.

Zhang L, Jiang J, Wozniak PJ, Yang X y Godke R (1995): Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 40: 338-344.

Zhao Y, Samal E y Srivastava D (2005): Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets

Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436:214-220.

Zo Z, Garbett D, Hill JL y Gross DJ (2005): Epidermal growth factor receptor downregulation in cultured bovine cumulus cells: reconstitution of calcium signaling and stimulated membrane permeabilization. *Reproduction* 130: 517-528

Zollner KP, Zollner U, Schneider M, Dietl J Y Steck T (2004): Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med Sci Monit* 10:CR1-CR7.

Zuelke KA y Brackett BG (1990): Luteinizing hormones enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol Reprod* 43: 784-787.

Zuelke KA y Brackett B (1992): Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro. *Endocrinology* 131: 2690-2696.

Zuelke KA y Brackett BG (1993): Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod* 48: 815-820.